EXPERIENTIA

EST EXPERIENTIA SCIENTIA PARACELSUS

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores: P. Huber, Basel · R. Matthey, Lausanne · A. v. Muralt, Bern · L. Ruzicka, Zürich

Redactor: H. Mislin, Basel · Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL (SCHWEIZ)

SOMMAIRE – INHALT – SOMMARIO – CONTENTS

Articles généraux – Übersichtsreferate
Articoli riassuntivi – Surveys

Cl. Schöpf: Die Konstitution der Salamander-Alkaloide . . . 285

Brèves communications – Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni – Brief Reports

M. Grünenfelder und S. Hafner: Das Zirkon-Alter granitischer Gesteine aus dem Gotthardmassiv 295

S. Haumont et J. Vincent: Zn^{65} et calcification du squelette . . 296

G. de Stevens and Angela Halamandaris: Stereochemical and Polar Effects in Bromination of Androstan-3-one Mannich Bases 297

H. R. von Gunten, H. Hügli und P. Tempus: Über I^{131}-Polyvinylpyrrolidon 299

P. Waser: Strukturabhängigkeit der Wirkung muscarinähnlicher Verbindungen 300

K. Pufahl und K. Schreiber: Isolierung eines neuen Guanidin-Derivates aus der Geissraute, *Galega officinalis* L. 302

F. Snyder and E. Cress: Choline Oxidase in Fatty Livers Induced by Cerium 303

H. Balzer, P. Holtz und D. Palm: Reserpin und Glykogengehalt der Organe 304

A. Stolk: Occurrence of Giant Nuclei and Pharyngeal Tumour in the Earthworm *Lumbricus terrestris* 306

A. Stolk: Enzymatic Activity (three Dehydrogenase Systems) of the Pharyngeal Tumour in the Earthworm *Lumbricus terrestris* 306

P. Ehrhardt und G. Voss: Die Carbohydrasen der Spinnmilbe *Tetranychus urticae* Koch (*Acari, Trombidiformes, Tetranychidae*) 307

W. Förster: Weitere Untersuchungen über strukturabhängige Wirkungsunterschiede bei Cardenoliden und Bufadienoliden . . 308

H. R. Morgan and A. P. Andrese: Malignancy *in vivo* of Chick Embryo Cells Infected with Rous Sarcoma Virus *in vitro* 309

D. H. Paul: Effects of Calcium on the Spontaneous Contractions of the Isolated Ventricle of the Snail *Helix pomatia* 310

W. Roth und E. Knüsli: Beitrag zur Kenntnis der Resistenzphänomene einzelner Pflanzen gegenüber dem phytotoxischen Wirkstoff Simazin 312

S. Kawamatu: Electronmicrographs on the Plastids in the Root of *Azolla imbricata* 313

M. J. Carver, Joy D. Marks, and Nadine Roesky: The Action of a Phenothiazine Derivative on Enzymes of the Pentose Phosphate Pathway 315

Lucienne Fenaux: Étude cytochimique des groupes sulfhydriles au cours des modifications de la détermination embryonnaire chez l'œuf de l'oursin *Paracentrotus lividus* 316

R. Hess and A. G. E. Pearse: Histochemical Demonstration of Uridine Diphosphate Glucose Dehydrogenase 317

J. Fischer und L. Friederici: Erythropoese bei bilateral nephrektomierten Kaninchen 318

K. Trnavský, Z. Trnavská, and V. Lapárová: Biochemical Changes Occuring during the Development of a Turpentine Granuloma 320

N. R. Di Luzio, E. E. Elko, N. R. Seidenverg, and C. Entenman: Effect of X-Irradiation on Triglyceride Metabolism of the Rabbit 321

E. G. Stenger: Beitrag zur Wirkung des Hygroton® 322

O. Pompeiano and J. E. Swett: EEG Synchronization Produced by Peripheral Nerve Stimulation 323

S. Albert, Kittie Tomson, and R. R. Small: The Effect of Litter Rank on the Secondary Sex Ratio 324

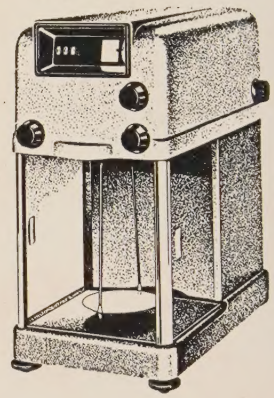
Lj. Grlić and A. Andrec: The Content of Acid Fraction in Cannabis Resin of Various Age and Provenance 325

A. Carpi and A. Pinto Corrado: Cerebral Vascular Action of Bradykinin in the Dog 326

H. Mislin: C. G. Jung (In Memoriam) 328

E. Mettler
Pelikanstrasse 19
Zürich

Garantierte
Genauigkeit
Konstante
Empfindlichkeit
Bessere
Reproduzierbarkeit



M 1

Liste des annonceurs – Verzeichnis der Inserenten – Elenco degli inserzionisti – List of advertisers – Experientia XVII/7

Bios Laboratories, Inc., New York
CIBA Aktiengesellschaft, Basel
Farmochimica Cutolo-Calosi S.p.A., Neapel
Ganz Optar AG, Zürich
J. R. Geigy AG, Basel
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel
E. Mettler, Zürich
Sandoz AG, Basel

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an frs. 74.–. Ce prix s'entend en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt Fr. 74.–.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, $^1/_2$ Seite Fr. 132.–, $^1/_4$ Seite Fr. 77.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può essere richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 74.–. Il prezzo è inteso in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription is sFr. 74.–. Price in Swiss currency.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, $^1/_2$ page fr. 132.–, $^1/_4$ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

© *1961 Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz), Telephon (061) 23 18 10; Telegrammadresse: Edita Basel*

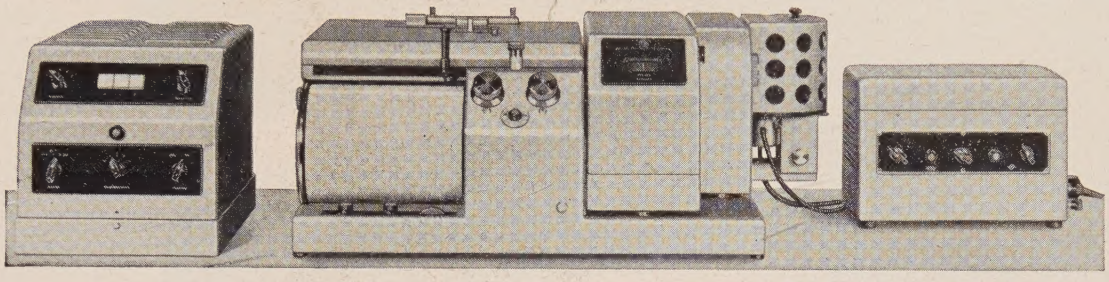
Printed in Switzerland by Birkhäuser AG., Basel

ZEISS

Registrierendes Spektralphotometer RPQ 20A

Besondere Merkmale:

- Zweistrahlverfahren mit elektrischer Quotientenbildung. Strahlenteilung ohne bewegte optische Elemente.
- Wahlweise Registrierung von Transmissionsgrad, Extinktion (von 0 bis 1 oder 1 bis 2) und Intensität.
- Wellenlängenbereich von 200 mμ bis 2500 mμ.
- Zusatzgeräte für Remissionsmessung im Zweistrahlverfahren, für die Registrierung von Fluoreszenz- und Flammenspektren im Einstrahlverfahren.



Bitte verlangen Sie den Prospekt Nr. 50-658/E

Zuverlässige Beratung und Service durch eigenes Fachpersonal

CARL ZEISS

Generalvertretung für die Schweiz:

GANZ Optar AG

ZÜRICH

Bahnhofstr. 40 Tel. (051) 25 16 75

WE NEVER SAY "NO"

WE SHIP YOUR ORDER TODAY

(Air Mail or Parcel Post, as you wish)

18,000

CHEMICALS FOR IMMEDIATE DELIVERY FROM STOCK. LARGEST VARIETY ANYWHERE

Ask for our new catalogue

BIOS *Laboratories, Inc.*

17 West 60th St., New York City 23, U.S.A.

Kabeladresse: BIOSLAB

NEUERSCHEINUNG

Vergleichende Physiologie

Band V: Physiologie der Erfolgsorgane

Prof. Dr. W. v. BUDDENBROCK, em. o. ö. Professor für Zoologie an der Universität Mainz (Deutschland)

390 Seiten mit 110 Tabellen, 161 Figuren und 1 Farbtafel

Preis gebunden Fr./DM 54.– (1961)

Sammlung «Lehrbücher und Monographien aus dem Gebiet der exakten Wissenschaften», Reihe der experiment. Biologie. Band 10

Gekürztes Inhaltsverzeichnis: Allgemeine Muskelphysiologie. Die Muskelphysiologie der einzelnen Tierstämme, Physiologie der Geissel- und Cilienbewegung. Die Protoplasmabewegung. Die Physiologie der Chromatophoren (Farbwechsel). Das tierische Leuchten. Die Produktion der elektrischen Energie.

Bereits erschienen sind:

Band I: Physiologie der Sinnesorgane. 504 S. mit 256 Fig. Leinen Fr./DM 46.– (1952).

Band II: Physiologie des Nervensystems. 396 S. mit 183 Fig. Leinen Fr./DM 39.– (1953).

Band III: Ernährung, Wasserhaushalt, Mineralhaushalt der Tiere. 678 Seiten, 241 Tabellen und 205 Figuren Leinen Fr./DM 68.– (1956).

Band IV: Hormone. 492 Seiten mit 115 Fig. und 106 Tab. Leinen Fr./DM 52.– (1950).

Band VI: Blut, Atmung, Excretion. In Vorbereitung.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung - Obtainable from your bookseller

BIRKHÄUSER VERLAG · BASEL UND STUTTGART

Am Anfang jedes chemischen Produktes steht die Forschung, und zwar

gezielte Forschung

Zufallstreffer sind selten geworden. Ein gut aufeinander abgestimmtes Räderwerk, in dem jeder Forscher Teilaufgaben löst, die näher und näher zum Ziel führen, bis eines Tages der Wurf gelingt, ist heute der einzig gangbare Weg. In den Geigy-Laboratorien führen Hunderte von qualifizierten Mitarbeitern jährlich Zehntausende von Versuchen durch. Dieser hohe Einsatz in gezielter Forschung bürgt dafür, daß Geigy auch in Zukunft bei Verbrauchern in der ganzen Welt auf Vertrauen zählen darf.

Geigy

J.R. Geigy A.G., Basel

A 7

EXPERIENTIA

Vol. XVII – Fasc. 7 Pag. 285–328 15. VII. 1961

Die Konstitution der Salamander-Alkaloide[1]

Von Cl. Schöpf*

Die zum 70. Geburtstag von Paul Karrer im Jahre 1959 an der Universität Zürich gestiftete Paul-Karrer-Vorlesung hat zunächst den Sinn, dem um die organische Chemie so hoch verdienten, immer noch unermüdlich tätigen Forscher eine Freude zu bereiten. Man pflegt in einem solchen Falle eine wissenschaftliche Arbeit zu widmen, und diese wird den zu Ehrenden um so mehr erfreuen, je näher sie seinen eigenen Interessengebieten steht und je deutlicher sie erkennen lässt, dass sie in dem Geiste und mit den Zielen durchgeführt ist, die ihn selbst bei seinen Arbeiten bewegten, je mehr er also an dieser Arbeit erkennt, dass sein Wirken in der Wissenschaft weiterlebt.

Nun sind die vielfältigen Arbeiten von Paul Karrer, über die in der ersten Paul-Karrer-Vorlesung[2] von A. Stoll ein Überblick gegeben wurde, so gut wie ausschliesslich der Erforschung von *Naturstoffen* gewidmet. Die Beschäftigung mit den Naturstoffen des Tier- und Pflanzenreiches hat aber noch etwas von dem ursprünglichen Reiz und kann noch die Begeisterung erwecken, die in früheren Zeiten wohl ein Entdeckungsreisender empfunden haben mag, wenn er in bislang unerforschte und unbekannte Gebiete der Erde vordrang. Sicher fand er dabei vieles, was mit bereits Bekanntem nahe verwandt war; er konnte aber auch damit rechnen, dass er auf neue, analogielose Dinge stossen und so reinste Entdeckerfreuden erleben würde.

Die Freude an dem unmittelbaren Erleben der vielfältigen Wunder der Natur, die mit der Erforschung der Naturstoffe verknüpft ist und die man aus den Veröffentlichungen von Paul Karrer herausfühlt, stand auch bei den meisten Arbeiten des Darmstädter Instituts für Organische Chemie Pate. Darin darf ich wohl eine Beziehung zu dem Lebenswerk von Paul Karrer sehen und damit eine Begründung dafür, dass gerade mir als erstem Nichtschweizer der Vorzug zugefallen ist, diese Paul-Karrer-Vorlesung halten zu dürfen.

Im folgenden wird nun über die Konstitutionsermittlung von Alkaloiden berichtet, die aus dem Tierreich stammen und nach der üblichen Auffassung der Alkaloide, die man als komplizierte stickstoffhaltige Pflanzenstoffe zu definieren pflegt, eigentlich gar nicht so genannt werden dürften. Es handelt sich um giftige, in Hautdrüsen erzeugte basische Stoffwechselprodukte des unregelmässig schwarz-gelb gefleckten *Feuer-* oder *Erdsalamanders* (*Salamandra maculosa* Laur.) und des damit sehr nahe verwandten, wesentlich kleineren, tief blauschwarzen *Alpensalamanders* (*Salamandra atra* Laur.). Wir wissen heute, dass die nahe Verwandtschaft dieser beiden Salamandra-Arten sich auch darin ausdrückt, dass sie in ihren Hautdrüsen die gleichen Alkaloide erzeugen.

Dass der Feuersalamander, dessen auffällige schwarzgelbe Fleckenfärbung[3] schon die Phantasie der Alchimisten erregte, ein giftiges Tier ist, war schon lange allgemein bekannt. Zalesky zitiert in einer ausführlichen, bis in das Mittelalter und Altertum zurückreichenden Zusammenfassung früherer Angaben über die Giftigkeit dieses Tieres[4] unter anderem einen Bericht über eine Frau, die sich ihres Mannes dadurch zu entledigen versuchte, dass sie einen Salamander in seiner Suppe mitkochte. Der Versuch misslang, vermutlich deshalb, weil das in den Hautdrüsen in grösserer Menge vorhandene Eiweiss beim Kochen gerann, den Giftstoff einhüllte und so seinen Übertritt in die Suppe verhinderte.

Dass das Gift in den Hautdrüsen ein *Alkaloid* ist, hat 1866 als erster Zalesky[4] erkannt. Er beobachtete, dass der mit Alkohol in Lösung gebrachte Giftstoff sich in verdünnter Salzsäure löst, dass mit Platinchlorwasserstoffsäure, Quecksilberchlorid und Phosphormolybdänsäure Niederschläge auftreten, und dass mit Ammoniak aus der sauren Lösung ein Niederschlag ausfällt, der mit Essigsäure wieder in Lösung geht. Für die nicht kristallisiert erhaltene Base prägte er den Namen *Samandarin*. In den Jahren 1898 bis 1900 nahm dann Faust[5] die Untersuchung des Alkaloids wieder auf. Er hielt die auch von ihm nur amorph erhaltene

* Darmstadt (Deutschland).

[1] Nach der am 15. Juni 1960 in der Aula der Universität Zürich gehaltenen zweiten Paul-Karrer-Vorlesung. Der Vortrag ist zum Teil gekürzt, Ergebnisse der letzten Zeit sind in die vorliegende Fassung eingearbeitet worden.

[2] A. Stoll, Experientia *16*, 85 (1960).

[3] Das Verhältnis von gelben zu schwarzen Hautpartien wechselt je nach der Herkunft der Tiere sehr stark. Die gelbe Farbe wird wie Th. Kauffmann und K. Vogt gezeigt haben (Chem. Ber. *92*, 2855 (1959)), durch in Guanin eingelagertes *D*-Lactoflavin hervorgerufen, dessen intensiv zitronengelbe Farbe durch die Gegenwart von Spuren von Carotinoiden ein wenig nach orangegelb verschoben ist.

[4] S. Zalesky, *Medizinisch-chemische Untersuchungen* (herausgegeben von Dr. F. Hoppe-Seyler, Berlin 1866), 1. Heft, p. 85.

[5] S. Faust, Arch. exp. Path. Pharmak. *41*, 229 (1898); *43*, 84 (1900).

Base irrtümlich für ätherunlöslich; ein kristallisiertes Sulfat lieferte keine brauchbaren Analysenwerte. Vier Jahre später untersuchte NETOLITZKY[6] den Giftstoff in den Hautdrüsen des Alpensalamanders, des bereits erwähnten nahen Verwandten des Feuersalamanders. Er stellte fest, dass auch hier ein Alkaloid die Giftigkeit dieses Tieres bewirkt, fand richtig, dass die Base in Äther löslich ist, hielt sie deshalb für verschieden von dem angeblich in Äther unlöslichen Samandarin von FAUST und nannte sie «Samandatrin». Tatsächlich sind die Alkaloide des Feuer- und des Alpensalamanders aber identisch, so dass sich der spätere Name «Samandatrin» erübrigt.

Die Untersuchung der Alkaloide wurde dann erst ein Vierteljahrhundert später von den Pharmakologen GESSNER und CRÄMER[7] wieder aufgenommen. Die Autoren gewannen das «Rohgift» des Feuersalamanders durch Aussaugen der Hautdrüsen mit einem unter Vakuum stehenden Glasröhrchen[8]. Die zunächst rahmartige milchigweisse Masse erstarrt dabei schnell zu zähen gummiartigen Brocken, deren Aufarbeitung einige Schwierigkeiten bereitet.

Um die chemische Erforschung der Salamanderalkaloide voranzutreiben, wandte sich GESSNER, der als Pharmakologe naturgemäss zunächst an der pharmakologischen Wirkung dieser Basen interessiert war, im Jahre 1930 an uns und überliess uns die Rückstände von Extrakten aus dem Rohgift. Es gelang bald, das darin enthaltene *Hauptalkaloid*, für das wir die Bezeichnung *Samandarin* übernahmen, kristallisiert darzustellen und seine Zusammensetzung zu bestimmen. Wir arbeiteten daraufhin eine bequeme Aufarbeitungsmethode für das Rohgift aus, die darin besteht, dass man die durch Aussaugen gewonnenen Rohgiftbrocken in Pepsin-Salzsäure einträgt, das im Laufe mehrerer Tage die Hauptmenge des Eiweisses in Lösung gehen lässt. Dabei scheidet sich ein erheblicher Teil des Samandarins bereits kristallisiert als Hydrochlorid aus der Lösung aus[9a]. Die restliche Base und die Nebenalkaloide lassen sich aus der alkalisch gemachten Lösung mit Äther ausschütteln; ein Nebenalkaloid, das Cycloneosamandion, geht erst aus stark alkalischer Lösung in den Äther.

Das Hauptalkaloid, das Samandarin, lässt sich leicht durch Kristallisation rein erhalten. Die Nebenalkaloide Samandaron, Samandaridin und Cycloneosamandion lassen sich in Form kristallisierter Salze abtrennen. Eine weitere Auftrennung der Nebenalkaloide liess sich schliesslich durch Craig-Verteilung zwischen Chloroform und wässriger Säure erreichen, wobei die einzelnen Fraktionen papierchromatographisch auf die darin enthaltenen Basen geprüft wurden.

Die Tabelle I gibt eine Übersicht über die bisher aus dem Rohgift des Feuersalamanders isolierten Basen, ihre Summenformeln[10] und die durch übliche Reaktionen und durch die IR-Spektren nachgewiesenen Funktionen des Stickstoffatoms und der Sauerstoffatome. In der Tabelle sind die Alkaloide in zwei Gruppen eingeteilt, nämlich in solche, die einen im IR-Spektrum leicht an charakteristischen Banden im Bereich von 11,5–12,5 erkennbaren *Oxazolidinring* enthalten, für den weiter unten der Nachweis erbracht

[6] F. NETOLITZKY, Arch. exp. Path. Pharmak. *51*, 118 (1904).

[7] O. GESSNER und K. CRÄMER, Arch. exp. Path. Pharmak. *152*, 229 (1930). – O. GESSNER und P. MÖLLENHOFF, Arch. exp. Path. Pharmak. *167*, 648 (1932).

[8] Die Tiere werden zunächst mit Kohlendioxid narkotisiert; dann wird das Rohgift ausgesaugt. Sie überstehen das ohne jeden Schaden, wenn man dafür sorgt, dass der beim Absaugen über das Tier verschmierte Anteil des Rohgiftes durch Abduschen so rasch entfernt wird, dass er nicht durch die Haut resorbiert werden und so das Tier vergiften kann. Die Tiere sind nach C. PHISALIX, C. R. Acad. Sci. *109* (II), 405 (1889), und nach unseren eigenen Erfahrungen gegen ihr eigenes Gift nicht immun. Ob und in welcher Zeit das Gift in den Hautdrüsen wieder regeneriert wird, ist noch nicht geprüft.

[9] Veröffentlichungen über Salamanderalkaloide aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Darmstadt: [a] C. SCHÖPF und W. BRAUN, Liebigs Ann. *514*, 69 (1934). – [b] C. SCHÖPF und K. KOCH, Liebigs Ann. *552*, 37 (1942). – [c] C. SCHÖPF und K. KOCH (mitbearb. von W. CONTZEN), Liebigs Ann. *552*, 62 (1942). – [d] C. SCHÖPF, H.-K. BLÖDORN, D. KLEIN und G. SEITZ, Chem. Ber. *83*, 372 (1950). – [e] C. SCHÖPF und D. KLEIN (mitbearb. von E. HOFMANN), Chem. Ber. *87*, 1638 (1954). – [f] C. SCHÖPF und O. W. MÜLLER, Liebigs Ann. *633*, 127 (1960). – [g] E. WÖLFEL, C. SCHÖPF, GERDA WEITZ und G. HABERMEHL, Chem. Ber. *94*, im Druck (1961) (aus dem Institut für Organische Chemie und dem E.-Zintl-Institut – Lehrstuhl für Strukturforschung – der Technischen Hochschule Darmstadt).

[10] Bei den nur in verschwindender Menge vorliegenden Nebenalkaloiden B und C reichte die bisher erhaltene Menge noch nicht zur Analyse aus.

Tab. I. Übersicht über die Alkaloide des Feuersalamanders (*S. maculosa* Laur.)

Bezeichnung	Summenformel	Schmelzpunkt	Funktion des Stickstoffs und der Sauerstoffatome	Zahl der Kohlenstoffringe
Alkaloide mit Oxazolidin-Ring				
Samandarin	$C_{19}H_{31}NO_2$	188°	>NH –O– >CHOH	3
Samandaron	$C_{19}H_{29}NO_2$	190°	>NH –O– >CO (5,75 μ)	3
Samandaridin	$C_{21}H_{31}NO_3$	290°	>NH –O– –CO–O–	3
Nebenalkaloid A	$C_{22}H_{33}NO_2$	191°	>NH –O– >CO (α,β-unges.)	?
Alkaloide ohne Oxazolidin-Ring				
Cycloneosamandion	$C_{19}H_{29}NO_2$	119°	>N—C(OH)– >CO (5,72 μ) bzw. >NH >C=O (5,85 μ)	3
Nebenalkaloid B	?	282°	— (evtl. Lakton)	?
Nebenalkaloid C	?	197°	— (kein CO)	?

wird, und in solche, die diese Atomgruppierung nicht enthalten.

Das Hauptalkaloid, das etwa zwei Drittel des Basengemisches ausmacht, das *Samandarin*, ist eine gesättigte sekundäre Base, die schön kristallisierte Salze liefert. Es besitzt neben dem bereits erwähnten, den sekundären Stickstoff und ein Sauerstoffatom enthaltenden Oxazolidinring eine sekundäre Hydroxygruppe. Oxydation mit Chromsäure liefert glatt das entsprechende Keton, das *Samandaron*, das das Samandarin als Nebenalkaloid im Rohgift begleitet. Beide Basen machen zusammen etwa drei Viertel der Gesamtalkaloide aus. Im restlichen Alkaloidgemisch sind nur noch *Samandaridin* und *Cycloneosamandion* in etwas grösserer Menge enthalten. Ersteres enthält zwei Kohlenstoffatome mehr als Samandarin und besitzt neben dem im IR-Spektrum leicht erkennbaren Oxazolidinring eine Lactongruppe; letzteres ist ein Isomeres des Samandarons. Beide Nebenalkaloide konnten noch nicht experimentell mit dem Hauptalkaloid verknüpft werden. Beim Cycloneosamandion ist es, wie weiter unten noch ausgeführt wird, überhaupt fraglich, ob es dasselbe Grundgerüst besitzt wie Samandarin. Die übrigen in der Tafel aufgeführten Nebenalkaloide sind noch nicht näher untersucht; die Angaben über die funktionellen Gruppen der Nebenalkaloide A, B und C beruhen bisher ausschliesslich auf deren IR-Spektren.

Allen vier näher untersuchten Alkaloiden ist gemeinsam, dass sie *drei Kohlenstoffringe* enthalten, wie sich leicht ableiten lässt, wenn man die funktionellen Gruppen der mit Ausnahme des Nebenalkaloids A gesättigten Alkaloide sich durch Wasserstoff ersetzt denkt und die Formeln der so abgeleiteten Grundkohlenwasserstoffe mit den Formeln der entsprechenden Alkane vergleicht.

Die *Alkaloidmengen*, die ein Feuersalamander in seinen über die ganze Oberseite des Tieres verteilten, am Hinterkopf zu dicken Paketen, den sogenannten Parotiden, gehäuften Hautdrüsen als passiv giftiges Tier[11] mit sich umherträgt, sind sehr erheblich. Ein Tier – die Männchen unserer Breiten wiegen durchschnittlich 15 g, die Weibchen 18 g – liefert etwa 32 bis 35 mg, aus Spanien stammende Feuersalamander vom Durchschnittsgewicht 18 g lieferten sogar bis 42 mg Alkaloidgemisch[9a]. Rechnet man die ersten beiden Zahlen auf menschliche Maßstäbe um, dann müsste ein Mensch von 80 kg Gewicht in seiner Haut etwa 150 bis 180 g Gesamtalkaloide und davon bis zu 100 g Samandarin mit sich umhertragen, wobei das Samandarin ein starkes Krampfgift ist, das etwa ein Drittel der Giftigkeit des Strychnins besitzt[12].

Die ersten Ergebnisse über die *Konstitution des Samandarins* und damit auch des Samandarons wurden durch den Hofmannschen Abbau erzielt. Er lieferte zusammen mit den weiteren Umwandlungen der dabei erhaltenen Abbauprodukte zunächst den Beweis für das Vorliegen der in Figur 1 in der Teilformel (1) unterhalb der gestrichelten Linie wiedergegebenen Atomgruppierung.

Als sekundäre Base gibt Samandarin beim Schütteln mit überschüssigem Methyljodid und Sodalösung in quantitativer Ausbeute ein N-Methyl-jodmethylat (2)[13], das sich mit guter Ausbeute in eine einheitliche des-Base (3) überführen lässt. Sie enthält noch alle Kohlenstoffatome des N-Methyl-jodmethylats, was beweist, dass der sekundäre Stickstoff im Samandarin einen Ring schliesst. Die in (3) neu entstandene Doppelbindung lässt sich in üblicher Weise, zum Beispiel durch katalytische Hydrierung zur gesättigten Dihydro-des-base, nachweisen.

Die des-Base zeigt nun die charakteristischen Eigenschaften eines *Enoläthers*. Während sie gegen Alkali beständig ist, wird sie schon durch verdünnte Säuren rasch und quantitativ in eine um 1 H_2O reichere, gesättigte «Oxydihydro-des-base» (4) übergeführt[9a,14]. Bei diesem Übergang verschwindet die Doppelbindung und es tritt statt dessen eine Carbonylgruppe und eine

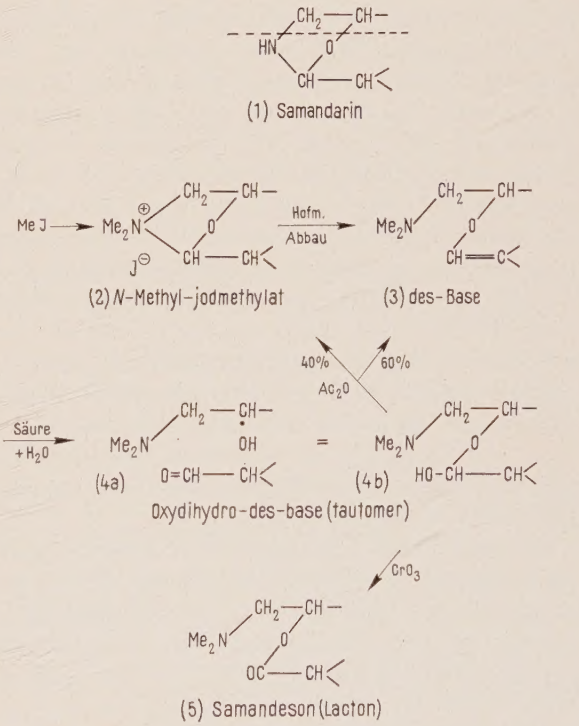


Fig. 1. Nachweis einer Aldehydammoniak-Gruppierung im Samandarin.

[11] Normalerweise macht der Feuersalamander von seinem Gift keinen Gebrauch; nur in der Todesangst, etwa beim Angriff eines jungen, unerfahrenen Hundes, wird aus den Hautdrüsen das Rohgift ausgepresst, das dann das Tier mit einem weisslichen Schleim überzieht.

[12] Von O. GESSNER intravenös an der Maus geprüft.

[13] Alle in dieser Zusammenfassung erwähnten Verbindungen sind, falls nicht das Gegenteil vermerkt ist, kristallisiert erhalten worden.

[14] Die Dihydro-des-base zeigt dagegen als normaler Äther diese Empfindlichkeit gegen verdünnte Säure nicht.

neue Hydroxygruppe auf[9c,15]; (4) kann auch tautomer als inneres Halbacetal (4b) reagieren und liefert zum Beispiel mit methanolischer Salzsäure wie ein Zucker einen Methyläther (4b; MeO- statt HO-). Auch bei der Oxydation mit Chromsäure reagiert die Oxydihydro-des-base tautomer als inneres Halbacetal; sie geht dabei in ein Lacton, das Samandeson (5)[9a,c] über[16]. Die bei der Einwirkung von Säure auf die Enoläthergruppierung der des-Base (3) neu entstandene Carbonylgruppe muss dementsprechend eine Aldehydgruppe sein.

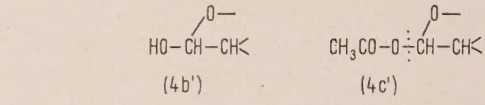
Die Doppelbindung der des-Base kommt beim Hofmannschen Abbau durch Austritt des Stickstoffs mit einem β-ständigen Wasserstoffatom zustande, was auf zweierlei Weise möglich ist. Entweder steht im Samandarin der Stickstoff entsprechend der Teilformel (1) an dem Kohlenstoffatom, das auch den Äthersauerstoff trägt, oder er greift am benachbarten Kohlenstoffatom an; in beiden Fällen kann beim Hofmannschen Abbau eine des-Base mit den Eigenschaften eines Enoläthers resultieren.

Die Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten wurde durch die Beobachtung erbracht, dass die Oxydihydro-des-base (4) mit der sicher nachgewiesenen Atomgruppierung (4b') beim Erwärmen mit Essigsäureanhydrid nicht nur unter Rückbildung der Enoläthergruppierung Wasser zur des-Base (3) abspaltet, sondern daneben auch zu 40% die quartäre Ausgangsverbindung (2), zunächst natürlich in Form des Acetats, zurückliefert[9c]. Das ist nur in der Weise möglich, dass ein primär entstehendes Acetat mit der Atomgruppierung (4c') den tertiären Stickstoff der des-Base analog alkyliert wie Essigsäuremethylester und andere Methylester Trimethylamin zu Tetramethyl-ammoniumsalzen alkylieren[17]. Aus dieser Rückbildung des quartären Salzes folgt mit Sicherheit, dass im Samandarin das Äthersauerstoffatom und der sekundäre Stickstoff im Sinne der Formel (1) an demselben Kohlenstoffatom angreifen, mit anderen Worten, dass das Samandarin ein innerer Aldehydammoniak ist.

Die geschilderten, in der Figur 1 wiedergegebenen Umsetzungen enthalten nur den Beweis für die in (1) unterhalb der gestrichelten Linie wiedergegebene Atomgruppierung. Dass diese zu dem in (1) formulierten *Oxazolidinring* zu ergänzen ist, geht aus weiteren in Figur 2 wiedergegebenen Umsetzungen hervor.

Obwohl Samandarin keine Carbonylgruppe besitzt, reagiert es doch in einer, wie wir heute wissen, für Oxazolidine charakteristischen Reaktionsweise glatt mit Methyl- und Phenyl-magnesium-halogeniden zu Methyl- bzw. Phenyl-samandiol[9a], Verbindungen, in denen der Äthersauerstoff des Samandarins unter Anlagerung eines Methyl- bzw. Phenylrestes in eine neue Hydroxygruppe übergegangen ist. Analog den Grignard-Verbindungen reagiert Lithiumalanat, das das Äthersauerstoffatom unter Anlagerung von zwei Wasserstoffatomen zu Samandiol (6) aufspaltet[9e]. Da dieses zu einem Diketon, dem Samandion (7), oxydierbar ist, muss der Äthersauerstoff in eine sekundäre Hydroxygruppe übergegangen sein; Samandiol (6) enthält beide Sauerstoffatome als sekundäre Hydroxygruppen.

Im Gegensatz zu Samandarin, das gegen Blei(IV)-acetat beständig ist, verbraucht nun das nur um 2 Wasserstoffatome reichere Samandiol[18] davon glatt 1 Mol unter Abspaltung von 1 Mol Formaldehyd[9e]. Die bei der Reduktion des Samandarins mit Lithiumalanat neu entstandene Hydroxygruppe muss danach einer durch Blei(IV)-acetat angreifbaren Atomgruppierung angehören. Man könnte an die Gruppen HO–C–CH_2OH oder –NH–C–CH_2OH denken, die beide 1 Mol Formaldehyd liefern müssten. Sie sind aber ausgeschlossen weil Samandiol keine primäre Hydroxygruppe enthält. So bleibt nur die Annahme, dass der Formaldehyd einer Atomgruppierung –NH–CH_2– entstammt, neben der das Kohlenstoffatom stehen muss, das die im



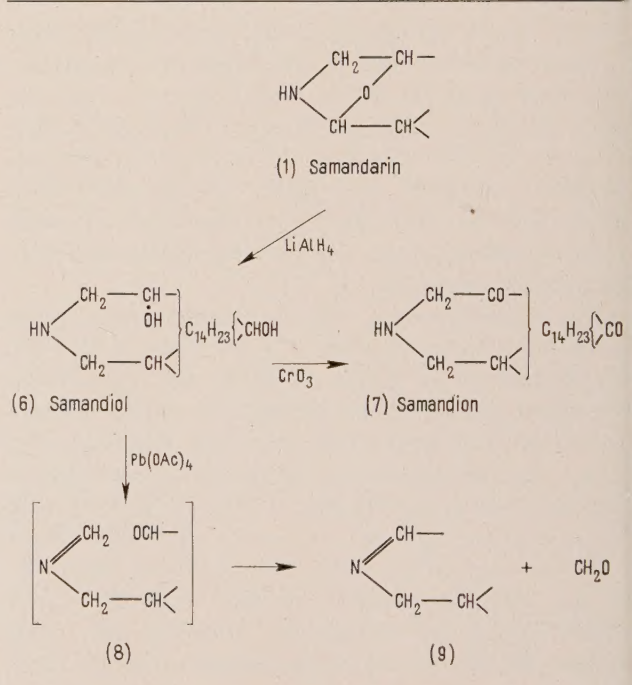


Fig. 2. Nachweis des Oxazolidinringes im Samandarin.

[15] Die ursprüngliche Hydroxygruppe des Samandarins ist an diesen Umsetzungen nicht beteiligt; mit Samandaron[9a] und mit dem beim Ersatz der ursprünglichen Hydroxygruppe des Samandarins durch Wasserstoff entstehenden Desoxysamandarin[9c] lassen sich dementsprechend die gleichen Umsetzungen durchführen.

[16] Bei der Oxydation wird natürlich gleichzeitig auch die ursprüngliche Hydroxygruppe des Samandarins zur Ketogruppe oxydiert.

[17] R. WILLSTÄTTER und W. KAHN, Ber. dtsch. chem. Ges. *35*, 2757 (1902).

[18] Methyl- und Phenylsamandiol verhalten sich analog[9d].

Samandiol neu gebildete und dessen Empfindlichkeit gegen Blei(IV)-acetat bedingende sekundäre Hydroxygruppe trägt. Samandiol enthält demnach die Atomgruppierung $-NH-CH_2-CHOH-$; der Abbau führt zunächst zu (8), einer Schiffschen Base des Formaldehyds, in der die neu entstandene Aldehydgruppe diesen unter Bildung des Spaltstücks (9) verdrängt. In ihm lässt sich die C=N-Doppelbindung durch katalytische Hydrierung und durch die Bildung eines gelben Dihydrochinazoliniumsalzes bei der Einwirkung von *o*-Aminobenzaldehyd[19] nachweisen[9d].

Die Kombination der durch die geschilderten Umsetzungen nachgewiesenen Atomgruppierungen führt zur Teilformel (1) für das Samandarin. Es enthält demnach einen Oxazolidinring, der sich auch im IR-Spektrum durch charakteristische Banden verrät[20]. Weiter führen die geschilderten Abbauwege nicht; sie sagen insbesondere nichts aus über die im Samandarin vorliegenden 3 Kohlenstoffringe und die 2 C-Methylgruppen, auf deren Gegenwart die Ergebnisse von C-Methylbestimmungen hinwiesen.

Auskunft über die Art und Verknüpfung der drei Kohlenstoffringe des Samandarins gab die *Dehydrierung* des Samandiols mit Selen bei 320–340°[9e]. Sie lieferte ein öliges Gemisch von Kohlenwasserstoffen, aus dem mit Trinitrobenzol oder 2,4,7-Trinitro-fluorenon jeweils 35% einer schön kristallisierten, bei 133° bzw. 146° scharf und konstant schmelzenden Molekülverbindung erhalten wurden[21]. Ihre Zerlegung ergab in beiden Fällen jedoch keinen einheitlichen Kohlenwasserstoff, sondern wiederum ein Gemisch von mindestens zwei Kohlenwasserstoffen, aus dem einer beim Stehen auskristallisierte und aus Methanol in einheitlichen Kristallen gewonnen werden konnte[22]. Die Analyse ergab die Summenformel $C_{15}H_{16}$[23], die einem Naphthalin mit angegliedertem, nicht dehydrierbarem 5- oder 7-Ring entspricht. Sein in Figur 3 wiedergegebenes UV-Spektrum ist das charakteristische durch drei Bandengruppen ausgezeichnete Absorptionsspektrum eines *Naphthalinkohlenwasserstoffes*, das allerdings gegenüber dem in Figur 3 gleichfalls wiedergegebenen Spektrum des unsubstituierten Naphthalins als Ganzes nach längeren Wellen verschoben ist.

Alle Versuche, den kristallisierten Kohlenwasserstoff auf chemischem Wege weiter abzubauen, scheiterten an den zu geringen zur Verfügung stehenden Mengen. Trotzdem gelang die Konstitutionsaufklärung durch Vergleich seines UV-Absorptionsspektrums mit dem anderer alkylsubstituierter Naphthalinkohlenwasserstoffe.

In der Literatur sind die UV-Spektren zahlreicher Mono-, Di-, Tri-, Tetra- und Penta-alkyl-naphthaline beschrieben, und man kann aus dem grossen Material folgende Gesetzmässigkeiten ableiten: Alkylreste verschieben das Spektrum des unsubstituierten Naphthalins als Ganzes nach längeren Wellen. Je mehr Alkylreste am Naphthalinring stehen, um so grösser ist der Betrag dieser Verschiebung. Er hängt dabei praktisch nicht von der Grösse des Alkylrestes ab – das Spektrum «merkt» nicht, ob nach der Methylengruppe Wasserstoff oder ein weiterer Alkylrest kommt –, wohl aber sehr stark von der Stellung des Alkylsubstituenten und

Fig. 3. UV-Absorptionsspektren des Naphthalins (I) und des kristallisierten Dehydrierungskohlenwasserstoffs (II) aus Samandiol.

[19] C. Schöpf und Fr. Oechler, Liebigs Ann. *523*, 1 (1936). Eine analoge Abspaltung von Formaldehyd wird bei der Perjodatspaltung des Hydroxyprolins (H. E. Carter und H. E. Neville, J. biol. Chem. *170*, 301 (1947), und H. E. Carter und Y. H. Loo, J. biol. Chem. *174*, 723 (1948)) sowie bei der Perjodat-Spaltung von 3-Hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-isochinolinen beobachtet (F. C. Pennington, M. Jellinek und R. D. Thurn, J. org. Chem. *24*, 565 (1959), und F. C. Pennington, L. J. Martin, R. E. Reid und T. W. Lapp, J. org. Chem. *24*, 2030 (1959)), die zu Indolen führt.

[20] Sie werden in analoger Weise von anderen, später aufgefundenen Oxazolidin-Alkaloiden gezeigt.

[21] Das Verhältnis Trinitroverbindung/Kohlenwasserstoff ist in der ersten Molekülverbindung 1:1, in der zweiten, tief blutrot gefärbten, aber 2:1.

[22] Für den Kohlenwasserstoff hatten wir[9e] als Schmelzpunkt 123° angegeben, das heisst die Temperatur, bei der die letzte Spur fester Substanz sich auflöste. Tatsächlich liegt, wie aus der Synthese des Kohlenwasserstoffs hervorgeht, sein Schmelzpunkt aber bereits bei 118–120° nach einem charakteristischen, unter dem Schmelzpunktmikroskop gut beobachtbaren Umwandlungspunkt bei 92°. Die zu hohe Schmelzpunktangabe für den Dehydrierungskohlenwasserstoff muss darauf beruhen, dass er noch eine geringe Menge einer hochschmelzenden Verunreinigung enthielt, deren Gegenwart sich aber weder in der Analyse noch im Absorptionsspektrum verriet.

[23] Die mit der üblichen Genauigkeit durchgeführten CH-Bestimmungen schlossen allerdings die homologe Formel $C_{16}H_{18}$ nicht völlig aus.

bei mehreren Alkylsubstituenten von ihrer gegenseitigen Stellung am Naphthalinring. Ein eingehender Vergleich des UV-Spektrums des kristallisierten Dehydrierungskohlenwasserstoffs mit den Spektren substituierter Naphthaline ergab nun, dass in ihm ein in den Stellungen 1,2,5,6-tetra-alkylsubstituiertes Naphthalin vorliegen muss[9e]. Auch die Reihenfolge der Intensitäten der vier Absorptionsbanden der langwelligen Bandengruppe wies auf das Vorliegen eines derartig substituierten Naphthalins hin. Nimmt man nun am Naphthalinring in 1,2-Stellung eine Substitution durch je eine Methylgruppe an, dann bleiben bei Annahme der Summenformel $C_{15}H_{16}$ gerade noch 3 Kohlenstoff- und 6 Wasserstoffatome für einen angegliederten 5-Ring, der die der 1,2-Stellung gleichwertige 5,6-Stellung einnehmen muss. Es konnte so ausschliesslich aus der Analyse und dem UV-Spektrum für den kristallisierten Dehydrierungskohlenwasserstoff die Konstitution (10) des *1,2-Dimethyl-5,6-cyclopenteno-naphthalins* abgeleitet werden[24]. Sie ist inzwischen durch die in Figur 4 kurz wiedergegebene Synthese[25] und den Vergleich der beiden Kohlenwasserstoffe, deren UV- und IR-Spektren übereinstimmen, bewiesen worden.

Wie bereits erwähnt, ist der kristallisierte Dehydrierungskohlenwasserstoff begleitet von öligen Kohlenwasserstoffen, deren chromatographische Trennung nicht gelang, die sich aber zum Beispiel durch fraktionierte Destillation mit Wasserdampf teilweise trennen liessen. Alle so gewonnenen Fraktionen stimmen aber in ihren Absorptionsspektren, insbesondere in der Lage und Höhe der Maxima so nahe überein, dass auch in diesen öligen Anteilen 1,2,5,6-tetra-alkylsubstituierte Naphthalinkohlenwasserstoffe vorliegen müssen.

Aus der Konstitution des kristallisierten Dehydrierungskohlenwasserstoffs folgt, dass im Samandarin zwei carbocyclische 6-Ringe und ein 5-Ring enthalten sein müssen. Der letztere verrät sich auch im IR-Spektrum des Samandarons, dessen bei 5,75 μ, also relativ kurzwellig liegende Carbonylbande auf die Stellung der Ketogruppe in einem Cyclopentanring hinweist.

Nachdem nunmehr einerseits die Atomgruppierung (1), andererseits die Atomgruppierung (11) nachgewiesen war, lag die Arbeitshypothese nahe, dass das Samandarin ein mit den Steroiden verwandtes Alkaloid ist, in dem das Kohlenstoffgerüst den Ringen B, C und D der Steroide entspricht, während die Atomgruppierung (1) einen modifizierten Ring A darstellt. Macht man diese Annahme, die noch besonders dadurch nahegelegt wird, dass in den Hautdrüsen der Kröten, die denen des Feuersalamanders entsprechen, das heisst, mit ihnen im biologischen Sinne homolog sind, ja bekanntlich Verbindungen mit dem Steroidgerüst gebildet werden, so ergeben sich für das Samandarin noch drei durch die Formeln (12) bis (14) wiedergegebene Konstitutionsmöglichkeiten, die alle den bisher mitgeteilten Ergebnissen Rechnung tragen. Sie lassen insbesondere auch verstehen, warum bei der Dehydrierung ein Gemisch von zwar immer in 1,2,5,6-Stellung, aber durch Substituenten verschiedener Grösse substituierten Naphthalinkohlenwasserstoffen entsteht. Zwischen diesen drei Möglichkeiten auf chemischem Wege zu entscheiden, gelang nicht. Zahlreiche Oxydationsversuche am Samandarin und seinen Umwandlungsprodukten, insbesondere auch solchen des bereits erwähnten Desoxysamandarins[15], in dem die Hydroxygruppe im 5-Ring durch Wasserstoff ersetzt ist, führten nicht zum Ziel.

So blieb als letzte Möglichkeit die *röntgenographische Strukturanalyse*, die von Herrn Prof. E. WÖLFEL durchgeführt wurde[9g]. Sie gelang mit den aus Methanol in Einkristallen gezüchteten monoklinen, isotypen Modifikationen des Samandarinhydrochlorids, -hydrobromids und -hydrojodids, die jeweils 2 Moleküle des

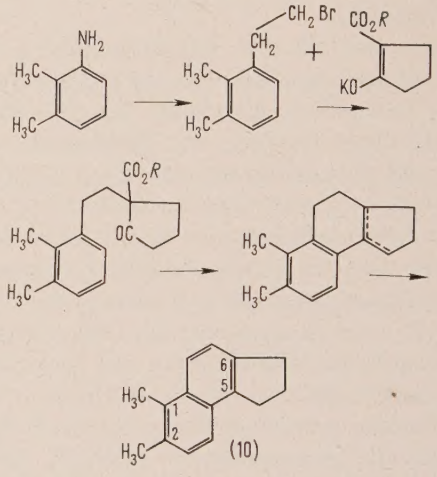
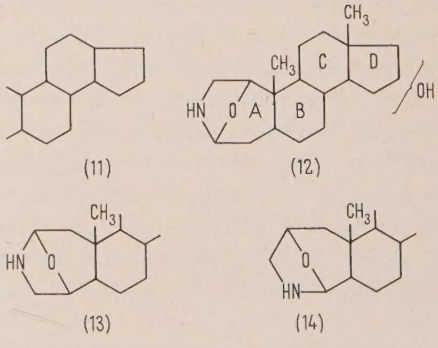


Fig. 4. Synthese des kristallisierten Dehydrierungskohlenwasserstoffs.



[24] Mit der einzigen, durch das UV-Spektrum und die Analyse nicht eindeutig auszuschliessenden Unsicherheit, dass vielleicht ein Wasserstoffatom eines der beiden Methylreste oder der Methylengruppen durch Methyl substituiert sein könnte.

[25] K. W. SCHRANZ, Dissertation, Darmstadt, im Druck (1961).

Salzes und 2 Moleküle Kristallmethanol in der Elementarzelle enthalten.

Die aus Weissenberg- und Drehkristallaufnahmen erhaltenen Gitterkonstanten und die Dichten der drei Salze sind in Tabelle II zusammengestellt. Aus Lauesymmetrie und Intensitätsstatistik ergibt sich die Raumgruppe $P2_1$.

Unter Benutzung gefilterter (Ni-Filter) Cu K_α-Strahlung wurden von allen drei Salzen Weissenberg-Aufnahmen um die b-Achse (2_1-Achse) hergestellt und die Intensitäten mit Hilfe von Intensitäts-Schwärzungsskalen visuell geschätzt.

Die Lage der Halogenionen wurde aus Patterson-Projektionen längs der 2_1-Achse ermittelt. Mit Hilfe der so erhaltenen x- und z-Parameter (x = 0,020; z = 0,120) wurden nun für das Hydrobromid und das Hydrojodid je zwei Fourierprojektionen längs der 2_1-Achse gerechnet. Die Vorzeichen der Strukturamplituden wurden nach zwei Verfahren bestimmt, und zwar (1) mit Hilfe der Punktlage des Schweren Atoms und (2) nach der Methode des isotypen Ersatzes, wobei die erste Methode die besseren Ergebnisse lieferte. Es wurden 19 Maxima gefunden, durch die die beiden Sechsringe, der Fünfring sowie der Siebenring mit der Sauerstoffbrücke festgelegt werden konnten.

Die weiteren Untersuchungen wurden am Hydrobromid durchgeführt. Durch eine Reihe von Fouriersynthesen, bei denen nunmehr die Vorzeichen der Strukturamplituden der (h0l)-Reflexe unter Berücksichtigung der Br^--Punktlage und der Punktlagen der neu hinzugekommenen Atome berechnet worden waren, wurden die Punktlagen der einzelnen Atome vervollständigt und verbessert, bis eine gute Übereinstimmung zwischen den beobachteten und berechneten (h0l)-Reflexen erreicht war. Die 8. und letzte Fouriersynthese ist in Figur 5 dargestellt. In ihr sind alle Atome gut aufgelöst; Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Brom lassen sich durch die verschiedene Elektronendichte deutlich unterscheiden. Das Maximum bei c/2 ist dem Kristallmethanol zuzuordnen.

Mit dieser zweidimensionalen Projektion sind die letzten Einzelheiten der *Konstitution* des Samandarins geklärt. Die in Figur 5 eingezeichneten Verbindungslinien zwischen den Atomschwerpunkten lassen erkennen, dass das durch Dehydrierung nachgewiesene und jetzt durch die röntgenographische Strukturanalyse bestätigte Cyclopentano-dekalin-System (11) tatsächlich den Ringen B, C und D der Steroide entspricht und dass an ihm an den für Steroide charakteristischen Stellen zwei Methylgruppen stehen. Sie lassen weiter erkennen, dass das durch die Umsetzungen der Figuren 1 und 2 nachgewiesene Oxazolidinsystem einem durch Einschiebung einer NH-Gruppe zum Siebenring erweiterten Ring A der Steroide entspricht. Die Verknüpfung des Oxazolidinrings mit dem Rest des Moleküls entspricht dabei der Formel (12). Die sekundäre Hydroxygruppe des Samandarins, die nach dem IR-Spektrum des entsprechenden Ketons, des Samandarons, im Ring D stehen muss, findet sich überraschenderweise nicht an C-17, sondern an C-16, also an einer Stelle, an der bisher wenigstens bei Steroiden Sauerstoff nur dann gefunden wurde, wenn gleichzeitig noch eine Seitenkette an C-17 vorhanden ist. Die Formel (12a) gibt die ermittelte Konstitution in der üblichen Schreibweise wieder. In der Figur 5 ist das Molekül (12a) von unten gesehen und erscheint so als Spiegelbild von (12a).

Um schliesslich auch die *Konfiguration* des Samandarins aufzuklären, wurden für dreidimensionale Fouriersynthesen Weissenberg-Aufnahmen von vier Schichtlinien gemacht und die Intensitäten photometrisch bestimmt. Die Übereinstimmung zwischen den beobachteten und berechneten 1424 Strukturamplituden war mit einem R_1-Faktor von 0,25 nach der zweiten dreidimensionalen Fouriersynthese befriedigend. Die Ergebnisse dieser Rechnungen[26] sind in Figur 6 in einer schnittweisen Projektion der dreidimensionalen Elektronendichte längs der b-Achse dargestellt, wobei Atome mit den grössten y-Parametern gegenüber ihren Nachbaratomen voll gezeichnet sind; darunterliegende Atome erscheinen verdeckt. Die Bindungslänge in Å sowie die Winkel zwischen den benach-

Tab. II. Gitterkonstanten und Dichten der Samandarinhydrohalogenide

	a	b	c	β	γ
Samandarinhydrochlorid	12,83 Å	6,15 Å	12,47 Å	93°	1,25 g/cm³
Samandarinhydrobromid	12,98 Å	6,28 Å	12,43 Å	95°	1,36 g/cm³
Samandarinhydrojodid	13,10 Å	6,50 Å	12,53 Å	97°	1,48 g/cm³

Fig. 5. Zweidimensionale Fourierprojektion $\varrho(xz)$ von Samandarinhydrobromid. Die punktierten Linien entsprechen der Elektronendichte 0, die ausgezogenen Linien geben die Elektronendichte in einem relativen Maßstab an.

[26] Die Rechnungen wurden im Institut für praktische Mathematik der Technischen Hochschule Darmstadt durchgeführt, deren Leiter, Herrn Prof. Dr. A. Walther, auch an dieser Stelle bestens gedankt sei. Eine einzige dreidimensionale Fouriersynthese erforderte einen Aufwand von rund 36 000 Lochkarten und 300 000 Rechenoperationen bei 43stündiger Rechenzeit an der IBM 650.

barten Atomen sind schliesslich in Figur 7 angegeben, die auch erkennen lässt, wie im Kristall das Bromion und das Kristallmethanol durch Wasserstoffbrücken mit dem Stickstoffatom und der Hydroxygruppe des Samandarins in Beziehung stehen.

Aus der Figur 6 ist nun die *Konfiguration* des Samandarins abzulesen. Der das Oxazolidinsystem enthaltende Ring A im Samandarin ist mit dem Ring B in *cis*-, dieser mit Ring C in *trans*-, und letzterer mit Ring D gleichfalls in *trans*-Stellung verknüpft. Das Grundgerüst des Samandarins entspricht demnach in seiner räumlichen Anordnung dem der Gallensäuren, das heisst des Koprostans bzw. des 5β-Androstans. Die Hydroxygruppe an C-16 steht auf derselben Seite der Molekülebene wie die angulären Methylgruppen, ist also β-ständig. Die Konfiguration des Samandarins wird danach durch die räumliche Formel (12b) wiedergegeben, die der ebenen Schreibweise (12c) entspricht. Die zugrunde liegende sauerstofffreie Verbindung, das Saman $C_{19}H_{33}N$, das bisher aus Samandarin noch nicht präparativ erhalten werden konnte, ist als 3-Aza-A-homo-5β-andro-stan zu bezeichnen.

Schliesslich hat sich auch die *absolute Konfiguration* des Samandarins auf Grund der Rotationsdispersionskurve des entsprechenden Ketons, des Samandarons, festlegen lassen[9g]. Ketone der Steroidreihe, die die Ringe C und D in der normalen *trans*-Verknüpfung tragen und deren Carbonylgruppe im Ring D an C-15, C-16 oder C-17 steht, unterscheiden sich in charakteristischer Weise zunächst dadurch, dass der Cotton-effekt beim C-16-Keton wesentlich grösser ist als bei den isomeren C-15- und C-17-Ketonen[27]. Der Cotton-effekt der Rotationsdispersionskurve des Samandarons entspricht nun wie zu erwarten in seiner Grösse dem eines C-16-Ketons der Steroidreihe. Die absolute Konfiguration der Umgebung der Ketogruppe drückt sich weiter in dem Vorzeichen des Cottoneffekts aus; entgegengesetzt konfigurierte Atomgruppierungen zeigen entgegengesetztes Vorzeichen[28]. Nun ist der Cotton-effekt des Samandarons ebenso negativ wie der eines C-16-Ketons der Steroidreihe mit der «normalen», das heisst allen natürlichen Steroiden gemeinsamen absoluten Konfiguration an C-13. Damit ist, da die absolute Konfiguration der Steroide bekannt ist[29], auch die absolute Konfiguration der Asymmetriezentren des Samandarons und Samandarins festgelegt. Sie entspricht der räumlichen Formel (12b). Da sie mit der der Steroide übereinstimmt, wäre es denkbar, dass Samandarin und Samandaron in den Hautdrüsen des Feuer- und des Alpensalamanders durch Ab- bzw. Umbau einer Steroidvorstufe entstehen.

Die Konstitution des *Samandaridins* ist noch nicht geklärt. Nach den bisher beobachteten Umsetzungen und nach dem IR-Spektrum gehören der sekundäre Stickstoff und ein nicht unmittelbar nachweisbares Sauerstoffatom einem Oxazolidinring an. Die beiden restlichen Sauerstoffatome bilden einen γ-Lactonring.

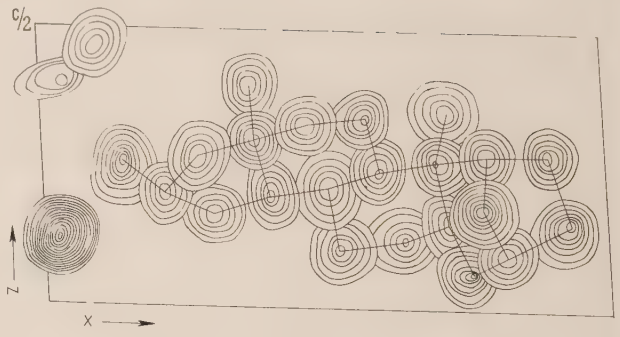


Fig. 6. Schrittweise Projektion des Samandarinmoleküls längs der b-Achse.

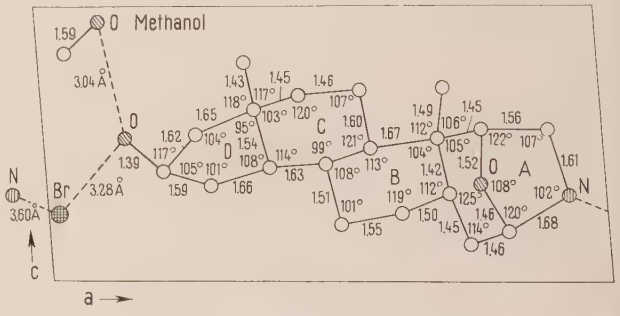
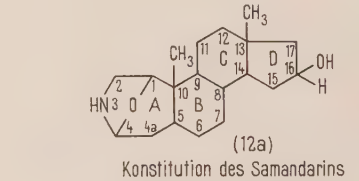
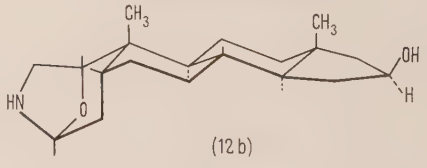
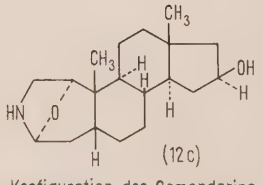


Fig. 7. Schematische Zeichnung des Samandaringerüstes im Kristall. Die Bindungslängen in Å sowie die Winkel zwischen den benachbarten Atomen sind angegeben.



Konstitution des Samandarins





Konfiguration des Samandarins

[27] C. DJERASSI, *Optical Rotation Dispersion* (McGraw-Hill Book Co., New York-Toronto-London 1960), p. 44.

[28] W. KLYNE, J. chem. Soc. London *1952*, 2921; J. Roy. Inst. Chem. *1960*, 50.

[29] Vgl. W. KLYNE, *The Chemistry of the Steroids* (Methuen Co. Ltd., London 1957), p. 23.

Ausserdem enthält Samandaridin 3 Kohlenstoffringe. Es liegt nahe, als Arbeitshypothese anzunehmen, dass Samandaridin das Kohlenstoff-Stickstoff-Gerüst des Samandarins enthält, an dem zwei weitere Kohlenstoffatome als Rest einer Steroidseitenkette an C-17 mit der sekundären Hydroxygruppe des Samandarins den γ-Lactonring bilden. Bewiesen ist dieser Zusammenhang aber noch nicht.

Im Gegensatz zu Samandarin, Samandaron, Samandaridin und dem Nebenalkaloid A (Tabelle I), die alle den Oxazolidinring enthalten, besitzt das extrem basische *Cycloneosamandion*, ein Isomeres des Samandarons, ebenso wie zwei weitere, bisher nur in minimaler, zur Analyse nicht ausreichender Menge gewonnene Nebenalkaloide (B und C der Tabelle I) keinen Oxazolidinring. Von den beiden Sauerstoffatomen des Cycloneosamandions liegt eines in Form einer Ketogruppe in einem Fünfring vor; das zweite liegt ebenfalls als Carbonylgruppe vor, die aber mit einer sekundären NH-Gruppe einen sehr beständigen, offenbar sterisch besonders begünstigten inneren Ketonammoniak bildet. Dieser Ketonammoniakgruppierung entsprechend kann Cycloneosamandion tautomer sowohl als tertiäres als auch als sekundäres Amin reagieren. Immer dann, wenn es, wie beim Übergang in ein N-Methyljodmethylat oder bei der Acetylierung zu einer nicht basischen N-Acetylverbindung als sekundäres Amin reagiert, tritt im IR-Spektrum die längerwellige Absorptionsbande der latenten Ketogruppe auf, die sich in diesen Derivaten dann auch chemisch nachweisen lässt.

Das Grundgerüst des Cycloneosamandions[30] enthält drei Kohlenstoffringe, darunter einen Fünfring, der die eine Carbonylgruppe trägt, und dieselbe Anzahl von C-Methylgruppen wie das isomere Samandaron. Man sollte danach eine nahe Verwandtschaft vermuten, und man ist versucht, auch für das Cycloneosamandion das Grundgerüst eines 3-Aza-A-homo-androstans anzunehmen. Überraschenderweise ist das aber nicht der Fall. Es gelingt leicht, den Sauerstoff der beiden sterisch offenbar nicht gehinderten Ketogruppen des Cycloneosamandions nach Wolff-Kishner durch Wasserstoff zu ersetzen und so die sauerstofffreie Grundsubstanz, das *Neosaman* $C_{19}H_{33}N$, darzustellen[9f]. Dieses Neosaman ist aber nicht identisch mit 3-Aza-A-homo-5α- oder -β-androstan und gleichfalls nicht mit dem isomeren 4-Aza-A-homo-5α- oder -β-androstan, Verbindungen, die SHOPPEE[31] inzwischen im Rahmen seiner Arbeiten über Aza-A-homo-steroide[32] hergestellt hat. Die bisher als Arbeitshypothese in Betracht gezogene Konstitution[9f] kann demnach nicht richtig sein. Da auch die röntgenographische Strukturanalyse bisher noch nicht zu Ende geführt ist, bleibt die Frage nach der Konstitution dieses Nebenalkaloids noch offen. Ihre Beantwortung dürfte gerade wegen der offensichtlichen Abweichung von der Grundstruktur des Samandarins für die Frage der Biogenese der Salamanderalkaloide von besonderem Interesse sein.

Völlig aufgeklärt ist demnach bisher nur die Konstitution, Konfiguration und absolute Konfiguration des *Samandarins* und *Samandarons*. Ihre Konstitution und Konfiguration lassen ihr und ihrer Umwandlungsprodukte chemisches Verhalten gut verstehen. Im Samandion (7) zum Beispiel sind die beiden Carbonylgruppen in ihrer Reaktionsfähigkeit so verschieden, dass es mit Semicarbazid nur ein Monosemicarbazon (an C-16) bildet. Die zweite Carbonylgruppe des Samandions an C-1 ist durch das benachbarte quartäre Kohlenstoffatom offenbar sehr stark gehindert. So gelang es bisher auch noch nicht, Samandion (7) nach Wolff-Kishner zum 3-Aza-A-homo-5β-androstan, dem «Saman» zu reduzieren. Die durch (12b) wiedergegebene Konfiguration des Samandarins lässt andererseits verstehen, dass der Hofmannsche Abbau nur in einer Richtung zur des-Base (3) erfolgt. In (12b) ist nämlich nur *ein* Wasserstoffatom – an C-4a – räumlich so angeordnet, dass es mit dem Stickstoffatom und den Kohlenstoffatomen 4 und 4a in einer Ebene und dabei in *trans*-Stellung zum Stickstoff steht. Nur dieses bietet also die für den glatten Verlauf des Hofmannschen Abbaus nötige sterische Voraussetzung[33].

Die Konstitution der tierischen Alkaloide Samandarin und Samandaron, die von den basischen Stoffwechselprodukten des Tierreichs allein die Bezeichnung «Alkaloid» verdienen[34], ist bisher ohne Analogie bei den Pflanzenalkaloiden; der Besonderheit des Vorkommens entspricht die Einmaligkeit der Konstitution. Was bisher nämlich an pflanzlichen Steroidalkaloiden bekannt wurde, enthält, wie die Solanum- oder Holarrhena-Alkaloide immer das intakte Kohlenstoffgerüst der Steroide, an das im Ring A oder in der Seitenkette Stickstoff – vermutlich durch Umsetzung von Carbonylgruppen mit Ammoniak mit nachfolgender Reduktion – eingefügt ist. Im Samandarin ist dagegen das Grundgerüst der Steroide durch Einschieben eines Stickstoffatoms zwischen den Kohlenstoffatomen 2 und 3 des Steroidgerüstes geändert.

Nimmt man an, dass Samandarin und Samandaron in den Hautdrüsen nicht von Grund auf synthetisiert werden, sondern aus einer «angelieferten» Steroidvorstufe entstehen, dann ergibt sich die Frage, wie die Besonderheiten des Samandarinmoleküls zustande

[30] Die Vorsilbe «Cyclo-» bezieht sich auf das Vorliegen der inneren Ketonammoniakgruppierung; die tautomere, «offene» Form des Cycloneosamandions, die nur in Derivaten beständig ist, wird von uns als «Neosamandion» bezeichnet[9f].

[31] Privatmitteilung von C. W. SHOPPEE; die Veröffentlichung darüber erscheint demnächst im J. chem. Soc. London.

[32] C. W. SHOPPEE und J. C. P. SLY, J. chem. Soc. London *1958*, 3458.

[33] Vgl. A. C. COPE, *Organic Reactions* (J. Wiley & Sons Inc., New York London 1960), vol. 11, p. 317.

[34] Was sonst an «tierischen Alkaloiden» in der Literatur beschrieben ist, steht immer einer Aminosäure ausserordentlich nahe, so dass das Kriterium einer gewissen Kompliziertheit der Konstitution fehlt; vgl. die Zusammenfassungen über tierische Alkaloide von D. ACKERMANN, Verh. physik.-med. Ges. Würzburg *50*, 230 (1952), und von M. SCHENK, Z. angew. Chem. *40*, 1081 (1927).

kommen können. Die eine, das Vorliegen eines Sauerstoffatoms an C-16 bei gleichzeitigem Fehlen der Steroidseitenkette an C-17, wäre verständlich, wenn die hypothetische Steroidvorstufe von vornherein Sauerstoff an C-16 tragen würde, wie das zum Beispiel beim Bufotalin aus den Hautdrüsen der Erdkröte der Fall ist, und wenn dann eine Seitenkette an C-17 bis zu einer Carboxylgruppe abgebaut würde. Die unmittelbare Vorstufe für den Ring D des Samandarons wäre dann eine β-Ketosäure (15), die ja leicht dekarboxyliert wird.

Die zweite Besonderheit, die Erweiterung des Ringes A zu einem 3-Aza-homo-Ringsystem, könnte als Fall einer «WOODWARD-Spaltung»[35] angesehen werden. WOODWARD hat erkannt, dass die Konstitutionen mancher Alkaloide in der Weise zusammenhängen, dass da, wo in dem einen Alkaloid ein an ein grösseres Ringsystem angegliederter Sechsring steht, in einem anderen statt dessen zwei Ketten aus je zwei Kohlenstoffatomen stehen, die durch Aufspaltung eines primär gebildeten Sechsrings entstanden sein könnten. Als Beispiel ist in Formel (16) der Ring E des Yohimbins wiedergegeben, der in dem im übrigen Teil des Moleküls gleich konstituierten Corynanthein (17) zu zwei Ketten aus je zwei Kohlenstoffatomen aufgespalten vorliegt. Der Oxydationszustand dieser Ketten kann dabei verschieden sein – statt Vinyl kann zum Beispiel auch wie in Emetin eine Äthylgruppe vorliegen – und häufig steht wenigstens eines der Enden der Ketten auf der Oxydationsstufe eines Aldehyds[36].

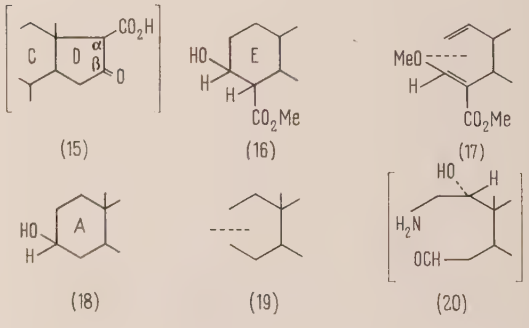
Nimmt man nun für die Biogenese des Siebenrings A im Samandarin eine solche WOODWARD-Spaltung an, dann sollte die unmittelbare Vorstufe des Samandarins eine Verbindung sein, in der der Ring A eines Steroids (18) zu zwei Ketten aus je zwei Kohlenstoffatomen aufgespalten wäre (19). Sie müsste an C-1 eine α-ständige Hydroxygruppe tragen, an C-2, dem Ende der einen C_2-Kette, eine Aminogruppe aufnehmen und schliesslich an C-3, das heisst an der Stelle, an der alle bisher bekannten Steroide Sauerstoff tragen[37], eine Aldehydgruppe besitzen. Eine solche Vorstufe der Konstitution (20) sollte mit grösster Leichtigkeit in das Oxazolidinsystem des Samandarins übergehen, das ja sterisch so begünstigt ist, dass es, einmal gebildet, sich gegen saure Hydrolyse als aussergewöhnlich beständig erweist.

Der aus Konstitutionsvergleichen abgeleitete Begriff der «WOODWARD-Spaltung» muss nun meines Erachtens nicht so gedeutet werden, dass im Laufe der Biogenese zunächst immer ein Sechsring entsteht, der dann neben einem Sauerstoff tragenden Kohlenstoffatom aufgespalten wird. Es ist demnach ebenso gut denkbar, dass die Salamanderalkaloide nicht aus einer «fertigen» Steroidvorstufe, sondern über eine im Ring A zwischen den Kohlenstoffatomen 2 und 3 geöffnete Vorstufe entstehen, mit anderen Worten, dass die Synthese des Steroidgerüstes hier vor dem Schliessen des Ringes A auf Abwege gerät, die möglicherweise auch den Aufbau der Seitenkette betreffen, die ja im Samandaridin und dem Nebenalkaloid A kaum dem üblichen Schema entsprechen kann.

In der Konstitutionsermittlung der Salamanderalkaloide spiegelt sich eine Entwicklung der Naturstoffchemie wieder, die durch das immer stärker werdende Einbrechen physikalischer und rechnerischer Methoden in die organische Chemie gekennzeichnet ist. Ein Pessimist möchte fast auf den Gedanken kommen, dass der klassische Organiker – wenigstens soweit er sich mit Naturstoffen befasst – zum Aussterben verurteilt sei.

Ich glaube nicht, dass dieser Pessimismus berechtigt ist. Die Isolierung und Reindarstellung neuer Naturstoffe wird angesichts der unübersehbaren Fülle, zum Beispiel der Inhaltsstoffe tropischer Pflanzen und der oft höchst eigenartigen Stoffwechselprodukte niederer Lebewesen, noch auf lange Zeit die Arbeit des Organikers erfordern. Das Studium des chemischen Verhaltens kann ihm nicht von der Physik oder einer Rechentechnik abgenommen werden, und schliesslich wird die Synthese komplizierter Verbindungen wie auch ihre Verknüpfung untereinander immer sein ureigenes Betätigungsfeld bleiben.

So besteht meines Erachtens kein Anlass zu einer pessimistischen Einstellung gegenüber der geschilderten Entwicklung. Ihr Sinn liegt vielmehr darin, dass der sich mit Naturstoffen befassende Organiker heute viel rascher zum Ziele der Konstitutionsermittlung kommt als früher, und dass er dieses Ziel erreicht, ohne die oft unendlich mühevolle Vorarbeit der Darstellung grosser Mengen an Ausgangsmaterial, ja schliesslich sogar da, wo in früheren Zeiten die Unmöglichkeit der Beschaffung einer ausreichenden Menge an Ausgangsmaterial seiner Arbeit eine unübersteigbare Grenze gesetzt hätte.



[35] R. B. WOODWARD, Nature [London] *162*, 155 (1948); Angew. Chem. *68*, 15 (1956).

[36] Von einer solchen Aldehydgruppe aus können weitere Umwandlungen erfolgen, zum Beispiel Kondensationen mit einer genügend reaktionsfähigen Stelle des Moleküls eintreten, was die Biogenese vieler komplizierter Alkaloide verstehen lässt.

[37] Im Falle einiger Pflanzenalkaloide findet sich statt dessen an dieser Stelle Stickstoff.

So ist aus dem engen, steilen und steinigen Pfad, den die Pioniere der Naturstoffchemie gehen mussten, heute ein breiterer und freierer Weg geworden, der ein rasches Fortschreiten ermöglicht und zu vordem unerreichbaren Zielen führt. Dass aber auch heute noch ein grosser Arbeitsaufwand erforderlich ist, geht aus der Kompliziertheit der Rechnungen für eine Konstitutions- und Konfigurationsermittlung auf röntgenographischem Wege hervor. So wird auch in Zukunft kein Neuland erobert werden können ohne den unermüdlichen Fleiss, der in der Chemie in besonderem Masse unentbehrlich ist, und der auch einen charakteristischen Zug des Lebenswerkes des verehrten Forschers darstellt, dem diese Übersicht gewidmet ist.

Summary. Four alkaloids have been isolated from the skin gland of the 'Feuer- and Alpensalamander' (*Salamandra maculosa* and *atra* Laur.). The structure, stereochemistry and absolute configuration of the principal alkaloid, samandarin, have been elucidated by chemical, optical, and X-ray-crystallographic methods. The basic structure of samandarin is derived from 5β-androstan by the insertion between C-2 and C-3 of ring A of an NH group which, along with an oxygen bridge between C-1 and C-3, constitutes an oxazolidine ring; at C_{16} there is a β-hydroxyl group. By virtue of its origin and constitution samandarin occupies a unique position among alkaloids.

Brèves communications – Kurze Mitteilungen – Brevi comunicazioni – Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Das Zirkon-Alter granitischer Gesteine aus dem Gotthardmassiv

U^{238}–Pb^{206}-, U^{235}–Pb^{207}- und Pb^{207}–Pb^{206}-Alter von Zirkonen aus dem Fibbiagneis und dem Rotondogranit wurden mit Hilfe der Isotopenverdünnungsanalyse bestimmt.

Es ergaben sich die folgenden Alterswerte:

(1) Granitischer Glimmer-Alkalifeldspatgneis vom Stausee Lucendro, St. Gotthardpass (sogenannter Fibbiagneis). U_{ppm}: 3413, Pb_{ppm} (radiogen): 141.

Alter in Millionen Jahren

U^{238}–Pb^{206}	U^{235}–Pb^{207}	Pb^{207}–Pb^{206}
290 ± 15	305 ± 20	390 ± 60

(2) Biotitgranit vom Chüebodenhorn (sogenannter Rotondogranit). U_{ppm}: 4507, Pb_{ppm} (radiogen): 94.

Alter in Millionen Jahren

U^{238}–Pb^{206}	U^{235}–Pb^{207}	Pb^{207}–Pb^{206}
140 ± 8	140 ± 10	170 ± 70

Das konkordante Alter im Fibbiagneis stimmt überein mit der aus bisherigen feldgeologischen sowie petrographischen Gründen gebildeten Meinung, dass es sich hier um ein Gestein handle, das während der *herzynischen* Gebirgsbildung entstanden ist.

Das konkordante Alter des Rotondogranites zeigt, dass dieser nicht herzynisch, also nicht prätriadisch ist, wie es bis heute angenommen wurde, sondern dass ihm ein *posttriadisches, alpines* Alter zukommt. Es wird somit die von Hafner[1] aus einigen geologischen und petrographischen Hinweisen vermutete Möglichkeit einer posttriadischen Entstehung bestätigt.

Die Aufbereitung der Mineralproben sowie die chemischen Analysen wurden am Institut für Kristallographie und Petrographie der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich, und die massenspektrometrischen Messungen am Physikalischen Institut der Universität Bern durchgeführt[2].

Ausführliche Arbeiten erscheinen demnächst in den Schweizerischen Mineralogischen-Petrographischen Mitteilungen.

Summary. The ages of two zircon samples from crystalline basement rocks in the Gotthard massif have been measured by isotope dilution methods. The results of the Fibbiagneiss can be interpreted as showing evidence of hercynian orogenic events 300 million years ago, thus substantiating or confirming earlier reports based on field geological and petrological work.

The Rotondo granite formerly grouped under hercynian rock types appears by its zircon age to belong to the young alpine granites. This result agrees with the work of Hafner[1] which has shown by petrofabric studies that the Rotondo pluton is devoid of any mineral orientation in contrast to the other rocks of the Gotthard massif which have achieved a prominent foliation and lineation during the alpine orogeny.

M. Grünenfelder und S. Hafner

Institut für Kristallographie und Petrographie, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich (Schweiz), 13. April 1961.

[1] S. Hafner, Schweiz. Min. Petr. Mitt. *38*, 255 (1958).

[2] Wir danken Herrn Dr. N. Grögler, Bern, für seine wertvolle Mithilfe.

Zn^{65} et calcification du squelette

L'histochimie a tout récemment démontré[1] la présence élective de zinc dans les structures squelettiques en voie de calcification. S'il existe normalement du zinc dans ces tissus, il est naturel de se demander si le radiozinc administré à l'animal y est détecté par la méthode autoradiographique. On sait déjà[2] que l'os accumule et retient longtemps le Zn^{65}. Mais on ignore le mode de distribution de cet élément à l'échelle histologique.

Nous avons injecté par voie intraveineuse à quatre jeunes singes de l'espèce *Cercocebus agilis* une solution de chlorure de Zn^{65} de haute activité spécifique (7918 mC/g de zinc), à raison de 1,5 mC/kg d'animal. Les os longs ont été prélevés à divers intervalles et fixés dans de l'éthanol à 95°. Des coupes ont été obtenues par usure de tranches transversales des diaphyses.

La présente note se borne à relever quelques observations recueillies dans l'os compact, principalement au stade de cinq jours après l'injection de Zn^{65}.

La Figure 1 reproduit à faible grossissement l'image autoradiographique laissée par une coupe sur un film Dentus Rapid (Gevaert) après une exposition de 10 jours. Le cliché est parsemé d'empreintes annulaires. Le long du bord médullaire, une traînée radioactive répond à une surface où s'appose de l'os nouveau.

L'interprétation précise des taches radioactives sera proposée dans un instant. Il faut d'abord attirer l'attention sur les espaces apparemment non radioactifs. La densité des grains d'argent réduit n'y est pas plus élevée que dans les régions de l'émulsion qui n'ont pas été en contact avec la coupe.

Il ne s'agit pas d'une illusion puisque l'impression visuelle est confirmée par l'histophotomètre de Lison[3]: si l'on règle au zéro l'échelle des densités optiques pour le voile de fond du film (en dehors de la préparation), les lectures qui se rapportent au tissu intercalé entre les empreintes bien visibles ne s'écartent pas du zéro.

Au surplus, on ne peut incriminer un artifice photographique qui ferait seulement ressortir une radioactivité assez importante, mais ne révèlerait pas une radioactivité faible. En effet, même après un contact prolongé entre la coupe et le film, l'histophotomètre n'indique pas le moindre noircissement en dehors des taches; celles-ci se sont évidemment empâtées et se prêtent mal dès lors à une illustration.

Enfin, une coupe provenant d'un animal sacrifié dix jours après l'injection apporte un nouvel argument pour l'absence de toute radioactivité décelable dans les zones qui n'impressionnent pas les émulsions photographiques. Toutes les empreintes radioactives dans l'épaisseur de la diaphyse y étaient par hasard groupées sur une surface réduite, tandis que le reste de la coupe n'avait laissé de traces qu'en bordure du périoste ou de la cavité médullaire. Cette disposition fortuite a permis de séparer aisément au bistouri sous le microscope le tissu contenant les structures radioactives et celui qui en paraissait dépourvu, à en juger par l'autoradiographie. Pour le petit fragment qui avait donné de belles marques autoradiographiques, on a trouvé, au compteur à scintillation, une valeur à peu près double de celle du back ground. Pour le reste de la coupe qui n'avait fourni aucune image autoradiographique et dont la surface était beaucoup plus étendue, le nombre de coups par minute ne dépassait pas le back ground.

On peut donc raisonnablement affirmer que le tissu osseux n'a pas retenu le Zn^{65} en quantités décelables en dehors des empreintes localisées que montre l'autoradiographie. Reste à analyser ces dernières. La Figure 2 nous y invite, qui réunit l'autoradiographie (A), le négatif microradiographique (B) et l'image histologique (C) d'une même région d'une coupe provenant du même stade de cinq jours. L'autoradiographie a été ici développée un mois après exposition sur un film Scientia 19 D 50 (Gevaert) dont le grain est sensiblement plus fin que celui du film Dentus Rapid.

Si nous superposons les deux premiers clichés (A et B), les marques radioactives coïncident avec des lamelles relativement peu calcifiées, qui, d'après la microradiographie,

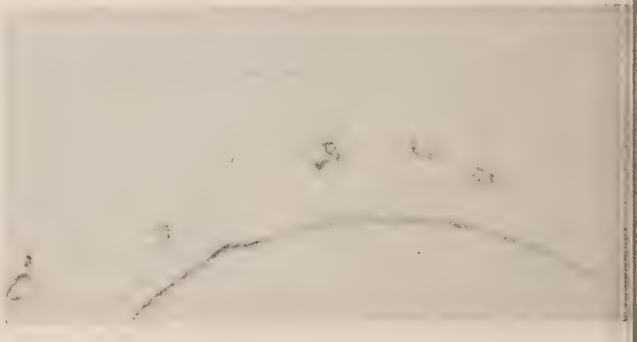
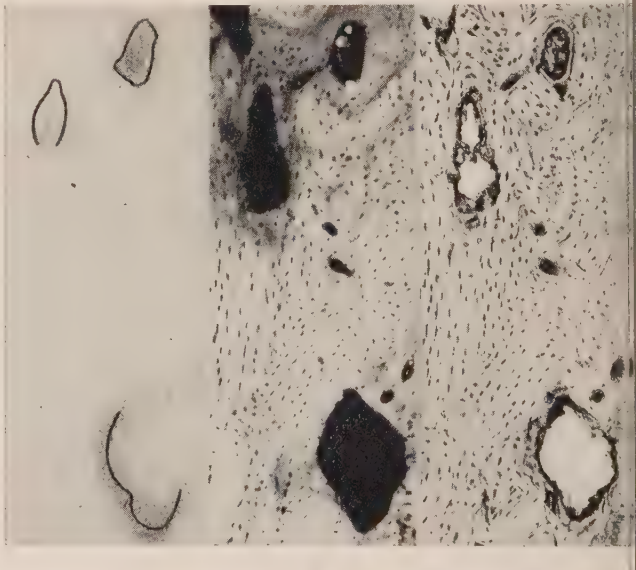


Fig. 1. Autoradiographie d'une coupe transversale de tibia prélevé cinq jours après injection de Zn^{65}. Quelques empreintes annulaires et une traînée médullaire se détachent sur un fond uniformément clair où ne se décèle aucune trace de radioactivité. (×10).



A B C

Fig. 2. Corrélations entre l'autoradiographie (A), la microradiographie (B) et l'image histologique (C) d'une coupe transversale d'humérus prélevé cinq jours après injection de Zn^{65}. La radioactivité appartient exclusivement à la limite du liseré préosseux bien colorée par le bleu de méthylène (C), décalquée sur l'autoradiographie (A) et répondant aux lamelles centrales relativement peu calcifiées visibles aux rayons X (B). (×58).

[1] S. HAUMONT, J. Histochem. Cytochem. *9*, 141 (1961).

[2] G. E. SHELINE, I. L. CHAIKOFF, H. B. JONES et M. L. MONTGOMERY, J. biol. Chem. *149*, 139 (1943). – I. G. F. GILBERT et D. M. TAYLOR, Biochim. biophys. Acta *21*, 545 (1956). – J. C. N. WAKELEY, B. MOFFATT, A. CROOK et J. R. MALLARD, Intern. J. appl. Rad. Isotopes *7*, 225 (1960). – D. M. TAYLOR, Nature *189*, 932 (1961).

[3] Don de la Rockefeller Foundation.

bordent des canaux haversiens. Or le pourtour de ces cavités apparaît incomplet sur l'autoradiographie pour deux des ostéones radioactifs. L'image histologique de la coupe décalcifiée et colorée au bleu de méthylène à pH 4,8 (C) démontre un détail supplémentaire essentiel: la présence de Zn^{65} est liée à celle d'un liseré préosseux.

Ce liseré préosseux s'inscrit à l'intérieur des couches calcifiées, seules visibles sur la microradiographie. Ses affinités tinctoriales ont été étudiées dans le laboratoire de Lacroix[4]. C'est en périphérie de ce liseré, le long d'une «ligne-frontière» clairement indiquée par le bleu de méthylène, que la substance organique de l'os commence brusquement à se charger de sels minéraux. C'est cette limite périphérique des liserés préosseux qui a été décalquée et reportée à l'encre sur l'autoradiographie. Bien entendu, elle correspond au contour des canaux haversiens tel que le dessinent les rayons X. Si l'on néglige l'inévitable diffusion des traces autoradiographiques, on doit admettre que la radioactivité est localisée le long de la ligne-frontière.

Il est hors de doute que le Zn^{65} se dépose dans le tissu qui est sur le point ou en train de se calcifier. Ajoutons incidemment que le cartilage de croissance retient, lui aussi, du Zn^{65} (observations inédites). Certes cet élément n'est pas le seul à se comporter de la sorte. Qu'il suffise de citer le Ca^{45}, dont la distribution hétérogène est si bien illustrée par l'autoradiographie[5], et certains colorants vitaux, parmi lesquels les tétracyclines ont fourni des images fluorescentes très démonstratives[6].

Mais on a observé[7] que les autoradiographies au Ca^{45}, en particulier quelques jours après l'injection, présentent un voile diffus qui traduit sans doute des réactions d'échanges. De même, d'autres radioéléments utilisés jusqu'à présent dans l'étude du métabolisme osseux peuvent démontrer les dépôts de substance minérale, mais ils se retrouvent aussi dans la masse du tissu déjà formé[8]. D'autre part, si l'on cherche un moyen d'évaluer par des mesures externes l'intensité des phénomènes de calcification dans une région déterminée du squelette, on ne peut, bien entendu, recourir au plomb[9] ni aux tétracyclines.

Le zinc, dont les isotopes 65 et 69 émettent des rayons γ, offrirait le double avantage de marquer électivement les sites de minéralisation et de ne pas se fixer dans les tissus squelettiques déjà calcifiés.

Enfin, il n'est pas sans intérêt de mentionner que, chez un singe sacrifié trois mois après injection de Zn^{65}, la radioactivité appartient à des lamelles osseuses calcifiées et enfouies dans la profondeur du tissu. Le zinc s'incorpore donc dans l'os, mais il y reste soustrait aux échanges et masqué pour l'histochimie.

Summary. Five days after intravenous administration of Zn^{65} to young monkeys, autoradiograms of compact bone show that radioactivity is exclusively located at the frontier line, where preosseous tissue is becoming mineralized. Since no diffuse reaction can be detected at this stage in the pre-existing calcified bone, it is concluded that Zn^{65} is not exchanged with the constituents of bone tissue, but does indicate accretion of new mineral substance.

S. Haumont et J. Vincent

Département d'Anatomie et d'Histologie, Université Lovanium, Léopoldville (Congo), le 16 mars 1961.

[4] J. Vincent, Arch. Biol. *65*, 531 (1954); *68*, 561 (1957). – P. Lacroix, in *Bone Structure and Metabolism* (Ed. Churchill, London 1956), p. 36. – C. P. Leblond, P. Lacroix, R. Ponlot et A. Dhem, Bull. Acad. Roy. Méd. Belg. *24*, 421 (1959).

[5] P. Lacroix, Bull. Acad. Roy. Méd. Belg. *18*, 489 (1953); Second Radioisotope Conference *1*, 134 (Ed. Butterworths, London 1954). – J. Vincent, *Recherches sur la constitution de l'os adulte*, Thèse Université Louvain (Ed. Arscia, Bruxelles 1955).

[6] J. P. Ghosez, Arch. Biol. *70*, 169 (1959). – W. H. Harris, Nature *188*, 1038 (1960).

[7] J. S. Arnold, W. S. S. Jee et K. Johnson, Amer. J. Anat. *99*, 291 (1956). – J. H. Marshall, R. E. Rowland et J. Jowsey, Radiation Res. *10*, 258 (1959). – R. Ponlot, *Le radiocalcium dans l'étude des os* (Ed. Arscia, Bruxelles, et Masson, Paris 1960).

[8] R. E. Rowland, Clin. Orthop. *17*, 146 (1960).

[9] T. Sato, Gunma J. Med. Sci. *2*, 183 (1953). – J. Vincent, Rev. Belge Pathol. Méd. Expér. *26*, 161 (1957).

Stereochemical and Polar Effects in Bromination of Androstan-3-one Mannich Bases

In a previous report[1] we outlined the preparation of Mannich bases of 3-ketosteroids. In particular, the preparation and configuration of 17β-hydroxy-2α-pyrrolidinomethyl-5α-androstan-3-one (I) was established. This communication is concerned with the bromination of I and its 17β-propionate ester (II) under thermodynamically and kinetically controlled conditions.

Bromination of I (or II) under thermodynamic control (excess hydrogen bromide in glacial acetic acid) gave rise to only one product, 4α-bromo-17β-hydroxy-2α-pyrrolidinomethyl-5α-androstan-3-one hydrobromide (III), m.p. 200–202°, $\lambda_{max}^{C_2H_5OH}$ 282 mμ, strong carbonyl band in the infrared at 1728 cm^{-1}. Dehydrobromination of III with lithium chloride in dimethylformamide gave 17β-hydroxy-2α-pyrrolidinomethyl-4-androsten-3-one, which was identical with a sample prepared earlier in an unambiguous manner[1]. Contrary to the findings of Djerassi[2] et al., on the bromination of 2α-methylcholestan-3-one under equilibrating conditions, we could not isolate, even in minute amounts, 2β-bromo-17β-hydroxy-2α-pyrrolidinomethyl-5α-androstan-3-one (IV). This may be due to the strong positive charge on nitrogen.

The bromination of I and its enol acetate was then carried out under kinetically controlled conditions (carbon tetrachloride and/or acetic acid containing sodium acetate). Once again, *only one* α-bromoketone derivative, m.p. 169° was isolated. Dehydrobromination of this substance gave a dihydropyranyl dimeric steroid similar to the one previously described[3] and a small amount of the Δ^1 derivative, m.p. 168–170° ($\lambda_{max}^{C_2H_5OH}$ 237 mμ, $\varepsilon = 8000$). Thus, bromination had occurred at C_2. The infrared absorption spectrum of this bromoketone showed one strong band at 1710 cm^{-1} and maximum absorption in the ultraviolet was found at 312–315 mμ. Therefore, the bromine is axially oriented leading to one of the conformations, each considered as the hydrobromide salt.

[1] G. deStevens and A. Halamandaris, J. org. Chem. *26*, 1614 (1961).

[2] C. Djerassi, N. Finch, R. C. Cookson, and C. W. Bird, J. Amer. chem. Soc. *82*, 5488 (1960).

[3] R. Mauli, H. J. Ringold, and C. Djerassi, J. Amer. chem. Soc. *82*, 5494 (1960).

In view of DJERASSI's findings[2,3], *a priori*, the boat structure Vb, obtained by a conformation 'flip' of Va to relieve the unfavorable 1,3-diaxial interaction of the pyrrolidinomethylene-methyl groups and the dipolar interaction of bromine-carbonyl, should be the expected product. Also, according to the axial halo ketone rule such a compound is expected to give a negative Cotton effect. In fact, however, the optical rotatory dispersion curve of the bromoketone in question was characterized by a strong positive Cotton effect[4] (Figure).

This establishes unexpectedly but unequivocally that the kinetically controlled bromination product is IV. Models reveal that direct equatorial entry of bromine is quite difficult due to steric hindrance imposed by the large pyrrolidinomethyl group. As a result, in the presence of large steric factors at C_2 (larger than a methyl group and at least equivalent in 1,3-non bonded steric effect to the angular methyl group), the axial attack of the reagent to the half-hair of the enol is the *only* course the reaction can take in spite of the steric influence of the angular methyl group.

Since it is conceivable that the hydrogen bonding effect of the proton and carbonyl in IV aids significantly in the A ring maintaining the chair form, it was of interest (a) to remove this source of intramolecular bonding and in so doing to impose a greater steric factor at C_2 and (b) to study the bromination of such a compound. Consequently, 17β-hydroxy-2α-pyrrolidinomethyl-5α-androstan-3-one methobromide (VI), m.p. 232°, carbonyl absorption in the infrared at 1710 cm^{-1} was prepared in the usual manner. Bromination of VI under kinetic control with bromine in acetic acid containing sodium acetate gave a product (VII) m.p. 176–176.5°, whose infrared carbonyl absorption band was displaced to 1730 cm^{-1} and an inflection was observed at 284 mμ in the ultraviolet region of the spectrum. This suggests an equatorial bromine. That it was not the 4α-bromo derivative was unambiguously shown by preparing the methobromide salt of III, m.p. 205–206°. The two substances were found to be distinctly different. Thus, compound VII is the 2-bromo derivative whose spectral properties indicate boat structure.

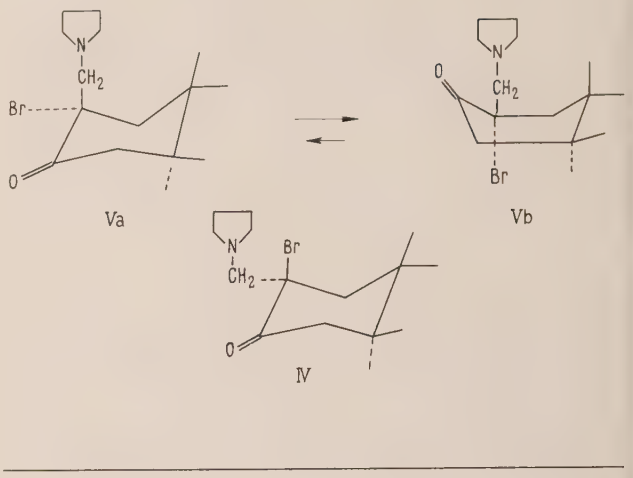
Once again because of the steric factors, axial bromination leads to VIIa. However, in this case the absence of hydrogen bonding effects plus the strong diaxial 1,3-bromine-methyl interaction results in a conformation 'flip' to the more stable VIIb with equatorial bromine.

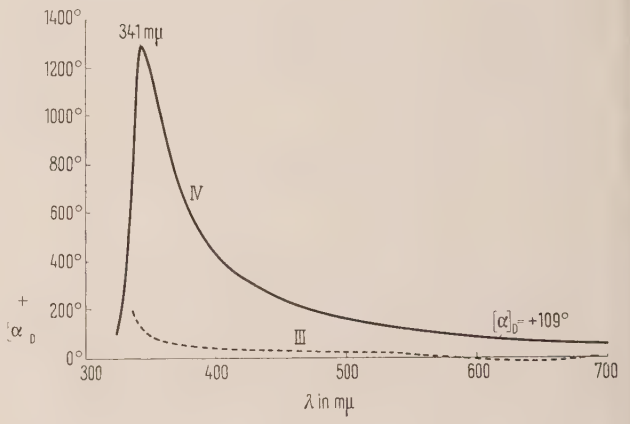
In summary, the above data serve to illustrate further the directional influence of steric factors in kinetically controlled brominations[5]. Thus, axial bromination under kinetic control occurs even when there is steric hindrance to axial approach of the reagent provided that the steric factors associated with α-substituents (in this case substituents at C_2 in 3-ketosteroids) are of such magnitude to prevent equatorial entry. However, the polar effect of the basic nitrogen may also be significant and further work along these lines is in progress to elucidate this matter.

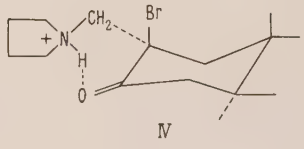
Zusammenfassung. Mannich-Basen von 5α-Androstan-3-one wurden unter thermodynamisch und kinetisch kontrollierten Bedingungen bromiert. Die Konformation der unter diesen Bedingungen erhaltenen Produkte wurde stark durch die sterischen und polaren Eigenschaften des Substituenten in 2-Stellung beeinflusst.

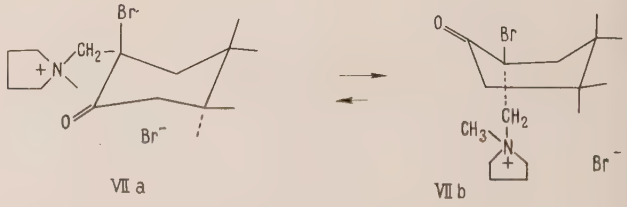
G. DESTEVENS and ANGELA HALAMANDARIS

Chemical Research Division, CIBA Pharmaceutical Products Inc., Summit (New Jersey), April 24, 1961.









[4] The authors are indebted to Professor R. K. HILL, Princeton University, Princeton (N.J.), for carrying out this determination.

[5] R. VILLOTTI, H. J. RINGOLD, and C. DJERASSI, J. Amer. chem. Soc. *82*, 5693 (1960).

Über I^{131}-Polyvinylpyrrolidon

Jodiertes Polyvinylpyrrolidon (PVP) wird seit einigen Jahren mit Erfolg für Untersuchungen über den Metabolismus von Eiweißstoffen im menschlichen Körper verwendet[1].

Das normale, aus *N*-Vinylpyrrolidon hergestellte PVP lässt sich relativ einfach jodieren[2]; doch ist das so gewonnene Produkt nicht stabil und spaltet leicht Jod ab. Gordon[3] beschrieb eine Methode zur Herstellung eines PVP, welches mit Jod beständigere Verbindungen bildet. Sein Produkt, das neben PVP auch etwas *p*-Toluidin enthält, wird im folgenden als PVP-T bezeichnet. Die Jodierung von PVP-T gestaltet sich nach der Vorschrift von Gordon einfach, doch wurde festgestellt, dass die Ausbeute gering ist und dass das so erhaltene Produkt während der Alterung immer noch viel Jod abspaltet. Durch Modifikation der Arbeitsbedingungen beim Jodieren gelang es uns, eine bessere Ausbeute und ein wesentlich stabileres Produkt zu erhalten: Es konnte ein mit I^{131} markiertes PVP-T hergestellt werden, das 40–50% (Gordon 20–25%) des angewandten I^{131} enthielt und das während mehrerer Tage genügend stabil war. In Abänderung der Vorschrift von Gordon wurde statt bei erhöhter, bei Zimmertemperatur unter Verwendung einer UV-Strahlenquelle jodiert. Das so erhaltene Produkt wurde nicht durch Dialyse, sondern mit einem Anionenaustauscher[4] (Amberlite JR-4B) gereinigt. Die jodierte PVP-T-Lösung wurde durch Keimfiltration sterilisiert und in einer isotonischen Kochsalzlösung oder mit Succinat gepuffert zur Anwendung gebracht.

Das PVP-T-I^{131}-Produkt wurde während der Jodierung und längere Zeit nachher papierchromatographisch untersucht (Figur). Die Chromatogramme wurden durch Messung der I^{131}-Aktivität in einem einfachen, selbst gebauten Radiographen ausgemessen. Die beobachteten I^{131}-Aktivitäten traten bei folgenden Rf-Werten auf: Jodid: Rf = 0,5–0,6 (Literaturwert: 0,53[5]). PVP-T-I^{131}: Rf = 0 (noch nicht sicher, ob von PVP-T); Rf = 0,8–0,9 (Hauptaktivität) (siehe Tabelle I).

Nach unseren Versuchen konnte das freie Jodid durch Dialysieren nur teilweise (bis auf 13%) entfernt werden. Dagegen wurde der Gehalt an freiem Jodid bei der Verwendung eines Anionenaustauschers (Elution mit demineralisiertem Wasser) unter 1% gebracht und ca. 40–50% der angewandten Aktivität blieben im PVP-T-Produkt zurück.

Das jodierte Produkt war ohne die Abtrennung des freien Jodids wenig beständig und spaltete schon nach kurzer Zeit bis zu 90% des eingebauten Jods ab. Dagegen war das Produkt nach der Behandlung durch den Ionenaustauscher während mehrerer Tage relativ beständig.

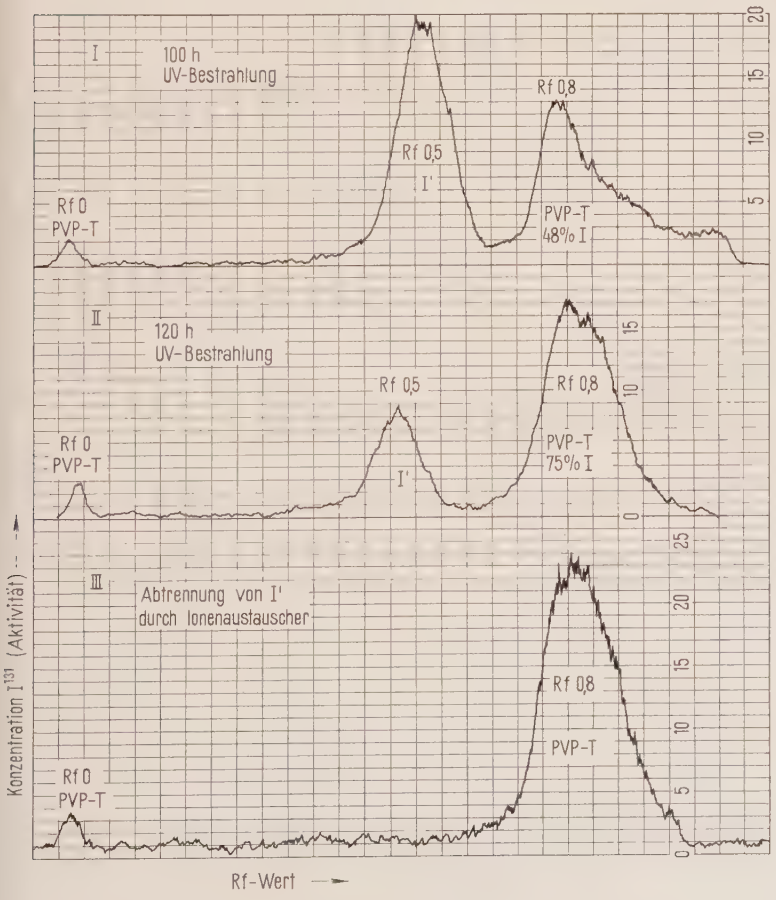
[1] S. Barandun, J. Aebersold, R. Bianchi, R. Kluthe, G. von Muralt, G. Poretti und G. Riva, Schweiz. med. Wschr. *90*, 1458 (1960).

[2] H. A. Ravin, A. M. Seligman, J. Fine, New Engl. J. Med. *247*, 921 (1952).

[3] R. S. Gordon, Jr., J. Polymer. Sci. *31*, 191 (1958).

[4] M. F. Sullivan, Int. J. Rad. Biol. *2*, 393 (1960).

[5] E. Lederer and M. Lederer, *Chromatography* (Elsevier, Amsterdam 1957).



Tab. I

UV-Bestrahlungszeit	«Eingebaute» Aktivität in % der Ausgangsaktivität
24 h	12
100 h	48
120 h	75
150 h	75

Die Chromatogramme lassen sich untereinander nur qualitativ vergleichen, da die Fliesszeit beim Chromatographieren nicht immer genau gleich war und auch die Empfindlichkeit des Strahlenmessgerätes nicht für alle Experimente gleich eingestellt worden ist. Die zwei oberen Chromatogramme zeigen die Veränderung der Aktivitäten in den beiden Hauptpeaks (Rf 0,5 und 0,8) während der UV-Bestrahlung. Chromatogramm III zeigt die Verteilung der Aktivitäten nach dem Passieren des Ionenaustauschers.

Tab. II

Tage nach der Bestrahlung	% freies Jodid
2	~0,3
4	1
6	1,5
10	4
20	8

Bei einem uns überlassenen, von Gordon jodierten Produkt betrug der Anteil an freiem Jodid nach 11 Tagen bereits 13% und nach 15 Tagen 17%. In einem andern Produkt machte das freie Jodid sogar 30% der Gesamtaktivität aus.

Aus der Tabelle II ist der prozentuale Anteil an freiem Jodid im gereinigten Produkt in Abhängigkeit von der Zeit zu ersehen.

Das jodierte PVP-T wird schon beim Eindampfen auf dem Wasserbad zersetzt, weshalb für die Sterilisation des jodierten PVP-T die Methode der Keimfiltration angewendet wurde.

Summary. A modification of the Gordon method for labelling polyvinylpyrrolidon with I^{131} is described. A more stable product with a higher iodine content has been obtained.

H. R. von Gunten, H. Hügli und P. Tempus

Eidg. Institut für Reaktorforschung, Würenlingen (Schweiz), 5. Mai 1961.

Strukturabhängigkeit der Wirkung muscarinähnlicher Verbindungen

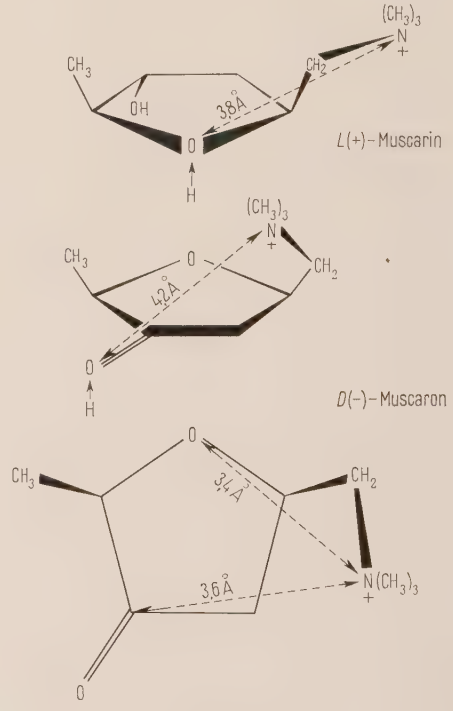
In der letzten Zeit ist die pharmakologische Wirksamkeit zahlreicher synthetischer Verbindungen mit muscarinähnlicher Struktur untersucht worden[1]. *L*(+)Muscarin (I) hat gegenüber *D*(−)Muscarin (II) und weiteren Stereoisomeren eine etwa 1000mal stärkere muscarinische Wirkung auf peripher parasympathische Synapsen. Thio-Muscarin, mit einem Thiophan an Stelle des Tetrohydrofuranrings, sowie zahlreiche homologe Verbindungen mit verschieden langen Seitenketten am C-Atom 2 sind ebenfalls über 1000mal geringer wirksam als das natürliche Alkaloid. Hingegen vermindert die Dehydrierung des Ringes (Doppelbindung C_4–C_5) die Aktivität kaum. Beinahe alle untersuchten Muscarinverbindungen mit Trimethylammoniummethylseitenkette zeigen keine nikotinische Wirkung an ganglionären oder neuromuskulären Synapsen. Dagegen sind Muscaron (VI, VII) und die meisten seiner Derivate noch stärker muscarinisch und auch stark nikotinisch, aber wenig stereospezifisch wirksam.

Die Untersuchung der pharmakologischen Wirkung einiger neuer synthetischer Verbindungen aus dieser Reihe[2] hat uns zu weiteren Überlegungen über die Korrelation von Molekülform (Konfiguration und Konformation) mit der Wirksamkeit gegenüber den cholinergischen Receptoren geführt.

Die Versuche wurden mit der bereits früher beschriebenen Technik an Katzen und isolierten Froschorganen (Herz und isolierter *Musculus rectus*) durchgeführt (Tabelle).

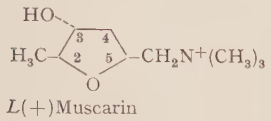
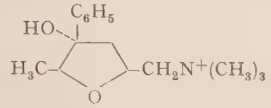
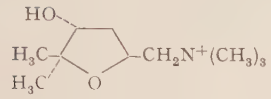
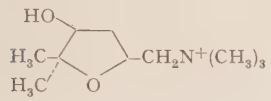
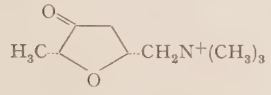
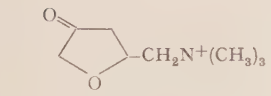
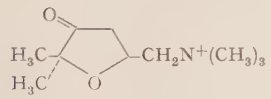
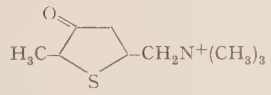
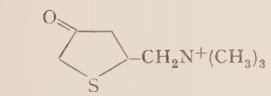
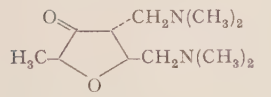
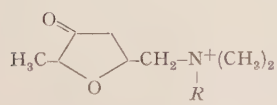
3-Phenyl-Muscarin (III) hat eine überraschend stark muscarinische sowie schwach nikotinische Wirkung, während 2-Me-Muscarin (IV) und 2-Me-Epimuscarin (V) ihre peripher cholinergische Wirkung beinahe vollständig verloren haben. Die sterische Hinderung der Hydroxylgruppe ist somit weniger wirkungsvermindernd als diejenige des Äthersauerstoffs. Desmethylmuscaron (VIII) ist auf periphere und ganglionäre Synapsen 40–100mal weniger aktiv als Muscaron. 2-Me-Muscaron (IX) hat im Gegensatz zu den analogen Muscarinderivaten eine starke Wirksamkeit behalten. Entfernung oder Verdoppelung der C2-ständigen Methylgruppe scheinen muscarinische wie auch nikotinische Wirkung bei Muscaron zu ermöglichen, das heisst die Stellung der Methylgruppe ist für die Bindung am Receptor von untergeordneter Bedeutung. Im Gegensatz zu Thiomuscarin und Desmethylthiomuscarin haben Thiomuscaron (X) und Desmethylthiomuscaron (XI) eine bedeutende muscarinische Aktivität, die gegenüber Muscaron nur um das 20–40fache vermindert und ähnlich derjenigen von Desmethylmuscaron (VIII) ist.

Die Verbindungen XII–XV zeigen, dass Veränderungen der quartären Trimethylammoniumgruppen ähnlich wie bei anderen Furanverbindungen muscarinische und nikotinische Wirkungen gleichmässig 1000–10000mal vermindern. Bei Homologen des Acetylcholins ($CH_3COOCH_2CH_2N^+(CH_3)_2R$) sinkt die Aktivität 10–100mal weniger.



[1] P. G. Waser, Exper. *14*, 356 (1958); *16*, 347 (1960). – L. Gyermek und K. R. Unna, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *98*, 882 (1958); J. Pharmacol. exp. Therap. *128*, 30, 37 (1960).

[2] Die Verbindungen I–V, IX, XII–XV wurden von E. Hardegger et al., Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, VI und VII von F. Häfliger und R. Denss, J. R. Geigy AG., Basel, VIII, X und XI von C. H. Eugster und K. Allner, Universität Zürich, synthetisiert und uns in verdankenswerter Weise zur Verfügung gestellt. Alle Stoffe sind Jodsalze der Racemate, ausser den *D*- und *L*-Antipoden des Muscarins und Muscarons. Die Stereostruktur der Verbindungen III und XII ist noch nicht gesichert.

		Katzen, γ/kg i.v. (Minimaldosen)			atropinisiert		Froschorgane γ/ml	
		(muscarinisch)			(nikotinisch)		(muscarinisch)	(nikotinisch)
		Blutdruck-senkung	Atmungs-verstärkung	Nickhaut-kontraktion	Ganglion-block	Muskel-lähmung	Froschherz $^1/_4$ Lähmung	Froschrectus submax. Kontr.
I		0,003	0,01	0,7	> 1000	> 1000	0,01	> 500
	$L(+)$Muscarin							
II	$D(-)$Muscarin	3,0	20	40				> 300
III		0,006	0,07	0,5	> 2,0	> 2,0	0,04	25
IV		9,0	1000	200	–	–	4,0	> 5000
V		15,0	200	200	–	–	6,0	> 5000
VI		0,001	0,02	0,2	10	30	0,0075	2,5
	$D(-)$Muscaron							
VII	$L(+)$Muscaron	0,003	0,1	0,2		50		10
VIII		0,06	20	30	> 100	30	8,0	
IX		0,05	0,2	3,5	> 200	> 200	1,5	30
X		0,04	5,0	5,0	> 500	150	1,0	50
XI		0,2	10,0	10,0	> 1000	200	4,0	50
XII		15	350	800	–	> 1000	29	> 2900
XIII		5,0	100	200	4000	4000	300	> 1300
	R:$CH_2CH_2C_6H_5$							
XIV	R: $CH_2C_6H_5$	270	700	> 2000	2000	3200	> 3200	> 1600
XV	R: $CH_2CH=CH_2$	14	80	60	1400	2800	700	> 1400

Die hier untersuchten Muscarinverbindungen bestätigen die auf Grund der Wirkung von Thiomuscarin gemachte Annahme, dass die muscarinische Wirkung durch Bindung der kationischen Ammoniumgruppe und durch Wasserstoffbrückenbindung am nucleophilen Sauerstoff des Furanringes erfolgt. Die mit der 2-Methylgruppe transständige Hydroxylgruppe verstärkt diese Bindung wahrscheinlich durch H-Brücken mit dem Receptor und bedingt die hohe Stereospezifität. Eine Bindung an nikotinischen Receptoren scheint nicht möglich zu sein. Sterische Hinderung der H-Brückenbildung des Receptors zum Äthersauerstoff vermindert die muscarinische Wirkung, während sterische Hinderung der Hydroxylgruppe die Aktivität kaum ändert.

Bei Muscaron dagegen haben die Abschirmung des Äthersauerstoffs durch 2 benachbarte Methylgruppen am C-Atom 2 wie auch der Austausch des Sauerstoffs mit dem weniger elektronegativen Schwefelatom im Ring nur wenig Einfluss auf die muscarinische Wirkung. Die Wasserstoffbrücke geht hier vom Receptor zum durch Polarisation viel stärker nucleophilen Carbonylsauerstoff.

Da Muscarin und Muscaron stärkste muscarinische Wirkung haben, müssen die verantwortlichen funktionellen Gruppen auf die gleichen cholinergischen Receptoren passen. Sie müssen daher auch ähnliche Atomabstände besitzen. Der maximale Abstand des quaternären N vom Äthersauerstoff im Muscarin beträgt 3,8 Å, wenn die Ammoniumseitenkette vom Furanring seitlich absteht. Beim Muscaron beträgt der minimal mögliche Atomabstand zwischen dem Stickstoffatom und dem Carbonylsauerstoff 4,2 Å, wenn die Ammoniumseitenkette über den Furanring hochgeschlagen ist. Diese Konformation ist im Dreiding-Stereo-Modell ohne starke Hinderung durch die N-Methylgruppen möglich. Sie erklärt, dass *D*-Muscaron, welches in seiner absoluten Konfiguration dem wenig aktiven *D*-Muscarin entspricht, wirksamer als *L*-Muscaron ist, indem die Seitengruppen relativ zur Carbonylgruppe sterisch eine ähnliche Lage wie die Seitengruppen des *L*-Muscarins zum Äthersauerstoff erhalten.

Die kürzlich von BECKETT et al.[3] publizierte Struktur des muscarinischen Receptors verlangt für Muscarin einen Atomabstand vom Stickstoffatom zum Äthersauerstoff von ca. 3,0 Å, was für die Bindung des Carbonylsauerstoffs des Muscarons unmöglich ist. Eine weiter entfernte zweite Bindungsstelle müsste befähigt sein, sowohl zur Carbonylgruppe H-Brücken zu bilden wie auch das Proton der Hydroxylgruppe des Muscarins aufzunehmen. Auch wird damit die gegenüber Muscarin umgekehrte Stereospezifität des Muscarons nicht erklärt.

Die nikotinische Wirkung des Muscarons beruht wahrscheinlich auf den polarisierbaren Elektronenwolken (π- und p-Orbitale) über dem Kohlenstoff der polaren Carbonylgruppe und dem Äthersauerstoff[4]. In der Konformation mit hochgeschlagener Ammoniumseitenkette ist der quartäre Stickstoff beinahe gleich weit vom Äthersauerstoff (3,4 Å) wie vom Carbonylkohlenstoff (3,6 Å) entfernt, das heisst das Molekül ist angenähert symmetrisch, was auch die geringe Stereospezifität des Muscarons erklären würde.

Basierend auf den gefundenen Relationen zwischen Konstitution und Wirkung kann eine Theorie der cholinergischen Wirkung von Muscarin und dessen Analoga aufgestellt werden[5], mit deren Hilfe möglicherweise Aufschlüsse über die aktive Form des Acetylcholins und den Bau des cholinergischen Receptors gewonnen werden können.

Summary. Relations between structure and biological activity of some new analogues of muscarine are demonstrated. From the results a theory of cholinergic action and the structure of active acetylcholine, as well as the cholinergic receptor, may be developed.

P. WASER

Pharmakologisches Institut der Universität Zürich (Schweiz), 20. März 1961.

[3] A. H. BECKETT, N. J. HARPER, J. W. CLITHEROW und E. LESSER, Nature *189*, 671 (1961).

[4] R. B. BARLOW, *Introduction to Chemical Pharmacology* (Methuen, London 1955), p. 127.

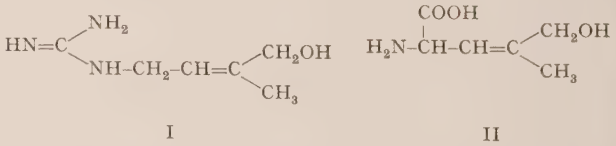
[5] P. G. WASER, *Chemistry and Pharmacology of Muscarine, Muscarone and some Related Compounds, Pharmacological Reviews*, in Vorbereitung.

Isolierung eines neuen Guanidin-Derivates aus der Geissraute, *Galega officinalis* L.

Aus Samen der Geissraute isolierten wir durch Chromatographie von Roh-Galeginsulfat[1] an Cellulosepulver (Schleicher & Schüll Nr. 123, Laufmittel *n*-Butanol, gesättigt mit 1,5 *n* HCl) neben Galegin [3-Methyl-but-2-enyl-guanidin-(1)][2] ein weiteres Guanidinderivat (I). Sein Hydrochlorid kristallisiert aus *n*-Propanol in Form farbloser Prismen vom Smp. 133–134° (korr.) und besitzt auf Grund der Elementaranalyse[3] die Summenformel $C_6H_{13}N_3O$. HCl (ber. 40,11% C, 7,85% H, 23,39% N; gef. 40,06, 40,19% C, 7,82, 7,76% H, 23,24, 23,29% N). Papierchromatographie: Papier Schleicher & Schüll 2043 b Mgl, 24 h aufsteigende Entwicklung bei 21–23° mit *n*-Butanol/1,5 *n* HCl gesättigt; Nachweis mit Sakaguchi-Reagens (Guanidin-Gruppe) bzw. alkal. $KMnO_4$-Lösung (C=C-Doppelbindung); Rf-Werte Galeginsulfat 0,80, I-Hydrochlorid 0,59.

Die wegen der positiven Sakaguchi-Reaktion wahrscheinliche Guanidinstruktur wird durch das IR-Spektrum[4] bestätigt [Banden bei 1620 und 1645 (monosubstituiertes Guanidin[5]), 3160, 3310 cm^{-1}]. Bei der katalytischen Hydrierung mit Platinoxyd in Eisessig oder Äthanol ist die H_2-Aufnahme (1 Mol) wie bei Galeginsulfat nach 5 min beendet; auf dem Chromatogramm ist dann keine $KMnO_4$-Reaktion mehr festzustellen. Der Sauerstoff liegt als leicht acetylierbare Hydroxygruppe vor.

Auf Grund dieser und weiterer experimenteller Befunde wird für das neue Guanidinderivat die Hydroxy-galeginstruktur I [4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-guanidin-(1)] vorgeschlagen.



I II

[1] E. SPÄTH und S. PROKOPP, Ber. dtsch. chem. Ges. *57*, 474 (1924).

[2] G. TANRET, C. R. Acad. Sci. *158*, 1182 (1914). – G. BARGER und F. D. WHITE, Biochem. J. *17*, 827 (1923).

[3] Die Mikroanalysen wurden von Herrn Dr. A. SCHOELLER, Kronach (Obfr.), ausgeführt.

[4] Herrn Dr. K. HELLER, Wissenschaftliche Laboratorien des VEB Jenapharm, Jena, danken wir für die Aufnahme der IR-Spektren.

[5] T. GOTO, K. NAKANISHI und M. OHASHI, Bull. chem. Soc. Japan *30*, 723 (1957).

Eine analoge Verbindung, und zwar die ungesättigte Aminosäure 5-Hydroxy-leucenin (II), wurde von WIELAND und SCHÖN[6] als Baustein des Knollenblätterpilz-Peptides Phalloidin festgestellt. Denkbar wäre, dass 5-Hydroxy-leucenin (II) und I biogenetisch miteinander verbunden sind (Decarboxylierung von II zu 4-Hydroxy-3-methyl-but-5-enyl-amin-(1) und Guanidierung dieser Verbindung zu I).

Papierchromatographisch konnten wir I in Blättern, Wurzeln, Blüten und Samen der Geissraute nachweisen; es war stets in geringerer Menge als Galegin vorhanden (Verhältnis etwa 1:4). Im alkoholischen Samenextrakt liessen sich noch drei weitere Guanidine (Sakaguchi-Reaktion) in weit geringeren Konzentrationen feststellen. Eine dieser Substanzen konnte mit Hilfe zweidimensionaler Papierchromatographie sowie authentischer Vergleichssubstanz als Arginin identifiziert werden[7].

Bei I handelt es sich wahrscheinlich um die bereits früher in *G. officinalis* neben Galegin papierchromatographisch nachgewiesene zweite Sakaguchi-positive Substanz[8]. Ob die Verbindung jedoch mit der schon von MÜLLER[9] aus *Galega*-Samen isolierten, aber nicht näher untersuchten Base identisch ist, bleibt fraglich.

Über weitere Arbeiten zur Konstitution und Synthese von I wird an anderer Stelle berichtet.

Summary. A new guanidine derivative has been isolated from the seeds of *Galega officinalis* L., for which the structure 4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-guanidine-(1) was proposed.

K. PUFAHL und K. SCHREIBER

Deutsche Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin, Institut für Pflanzenzüchtung, Quedlinburg (Deutschland), 24. April 1961.

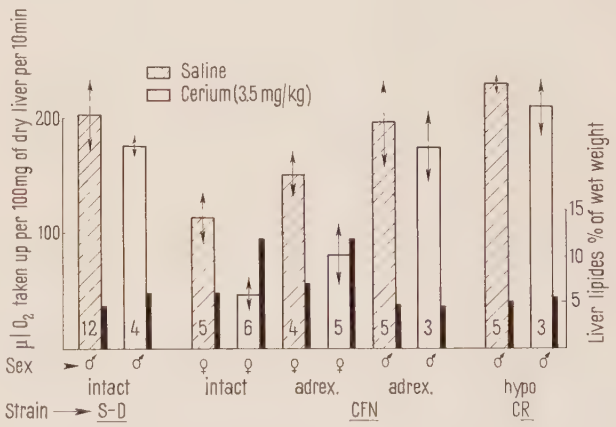
[6] TH. WIELAND und W. SCHÖN, Liebigs Ann. *593*, 157 (1955).
[7] Vgl. dagegen [9].
[8] M. MOURGUE und R. DOKHAN, C. R. Soc. Biol. *148*, 1434 (1954). – J. KOLOUŠEK, M. KUTÁČEK und J. BÍLEK, Sbornik československo. Akad. Zemědělské ved *28*, 649 (1955).
[9] H. MÜLLER, Z. Biol. *83*, 239 (1925).

Choline Oxidase in Fatty Livers Induced by Cerium[1]

We have previously shown that lipotropic substances, including choline, have no effect in preventing the fatty liver degeneration caused by cerium[2], and in this respect the rare-earth fatty liver is different from the ethionine-fatty liver[3]. Since the choline result was negative in rare-earth injected rats, we wondered whether the metal in any way influenced choline oxidase. Furthermore, the possible correlation of the hepatic choline oxidase activity in various species to the ease with which fatty infiltration of liver occurs during dietary choline deficiency has been stressed by some investigators[4,5]. SIDRANSKY and FARBER[5] have re-emphasized the point that the choline pool varies inversely with the choline oxidase activity. Animals with a larger choline pool might thereby be expected to be more resistant to fatty infiltration brought about by a choline deficiency. We were especially concerned with the possible involvement of this enzyme in the development of fatty livers caused by certain members of the cerium rare earth group[6]; of seven species tested, the rat and mouse are most susceptible to the fatty infiltration induced by these elements. Both of these species have very high levels of choline oxidase and are extremely susceptible to fatty infiltration triggered by a choline deficiency. Under certain hormonal conditions[2] rats injected with cerium do not develop fatty livers; in this paper we have tried to determine whether this difference in lipide response of the rats injected with cerium could be related to the hepatic choline oxidase level and in turn to the ease with which choline deficiency can be induced under these hormonal conditions.

Rats weighing between 150 and 200 g were maintained on Rockland Rat Diet until 24 h before sacrifice, at which time all animals were fasted. Water was always available. The cerium-treated rats were injected intravenously with 2 mg of the metal/kg of body weight in the form of the chloride salt; control animals received an equivalent volume of saline. All rats were killed 48 h after the injections. Choline oxidase was determined in liver homogenates according to the technique of WILLIAMS[7]. Total lipides were extracted and determined as described before[2].

It is apparent from the data in the Figure that the animals eventually developing fatty livers always had a lower liver choline oxidase activity than those not developing the fatty infiltration. For example, this enzyme is significantly lower in the intact CFN female controls and the adrenalectomized CFN females, both of which get fatty livers if cerium is given intravenously. On the other



Liver choline oxidase 48 h after intravenous cerium. → represents ± 1 standard deviation from the mean value. SD = Sprague-Dawley; CFN = Carworth Farm Nelson; CR = Charles River; adrex. = adrenalectomized; hypo. = hypophysectomized. The large hatched bars (saline controls) and open bars (cerium-injected) represent µl O_2/100 mg dry liver/10 min. The solid bars represent the average of total liver lipides.

[1] Under contract with the United States Atomic Energy Commission.
[2] F. SNYDER, E. A. CRESS, and G. C. KYKER, J. Lipid Res. *1*, 125 (1959).
[3] E. FARBER, M. V. SIMPSON, and H. TARVER, J. biol. Chem. *182*, 91 (1950).
[4] P. HANDLER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *70*, 70 (1949).
[5] H. SIDRANSKY and E. FARBER, Arch. Biochem. Biophys. *87*, 129 (1960).
[6] F. SNYDER, E. A. CRESS, and G. C. KYKER, Nature *185*, 480 (1960).
[7] J. N. WILLIAMS, Jr., G. LITWACK, and C. A. ELVEHJEM, J. biol. Chem. *192*, 73 (1951).

hand, the controls of the Sprague-Dawley males, the adrenalectomized CFN males and the hypophysectomized Charles River males have significantly higher levels of hepatic choline oxidase and do not get fatty livers if given cerium intravenously. These results are exactly opposite to what one would reason from the theory concerning the relationship of choline oxidase and susceptibility of an animal to choline deficiency. These data indicate, then, that a choline deficiency is not an important causative factor in the fatty infiltration of liver induced by cerium. On the other hand, the liver choline oxidase activity is substantially reduced from control values in all animals that did develop the fatty livers. This inhibition is not completely explained by the diluent action of the fat, since the inhibition is still evident when the enzyme activities reported in the Figure are corrected to a fat free basis. The percentage of liver lipides on a wet and dry weight basis in CFN female rats for two controls were 4.78, 4.25 (wet); 15.86, 13.91 (dry) and for two cerium-injected rats percentages were 15.22, 16.47 (wet); 45.05, 47.75 (dry). The inhibition observed when the fat-free calculation is used is probably caused by the metabolic effect of lipides on this enzyme system[8,9] and not caused by the cerium *per se*, since choline oxidase activities measured 24 h after the cerium injection (about 70% of the cerium dose being in the liver and essentially no fatty infiltration) is in the same range as controls.

Zusammenfassung. Der Cholinoxidase-Spiegel in Rattenleberbrei wurde nach intravenöser Verabreichung von Cerium gemessen. Die experimentell erhaltenen Werte zeigen, dass die vom Cerium verursachte Fetteinlagerung weder von der Art der Ratten noch von ihrem hormonalen Zustande abhängt. In Fettlebern scheint die Enzymhemmung mehr von ihrem Lipoidgehalt als von ihrer Ceriumkonzentration bestimmt zu werden.

F. SNYDER and E. CRESS

Oak Ridge Institute of Nuclear Studies, Medical Division, Oak Ridge (Tenn.), March 20, 1961.

[8] F. BERNHEIM, J. biol. Chem. *133*, 291 (1940).
[9] F. L. HUMOLLER and H. J. ZIMMERMANN, Amer. J. Physiol. *174*, 199 (1953).

Reserpin und Glykogengehalt der Organe[1]

Nach Reserpin ist der Glucose-[2] und Milchsäuregehalt[3] des Blutes erhöht, der Grundumsatz steigt bei Ratten an[4], es kommt zu einer Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung[5]. Es wäre deshalb zu erwarten, dass der Gehalt der Organe an Glykogen und energiereichen Phosphorsäureverbindungen abnimmt.

Versuche. Männliche weisse Mäuse (18–20 g) erhielten nach 24stündiger Nahrungskarenz 5 mg/kg Reserpin (50 mg/kg Reserpinascorbat), Kontrolltiere die entsprechende Menge Ascorbinsäure subcutan. Sämtliche Tiere wurden unter weiterem Nahrungsentzug bei 25°C gehalten.

1, 3, 12 und 18 h nach der Injektion von Reserpin wurden jeweils mindestens 6 Tiere durch Eintauchen in flüssige Luft getötet. Die Organe wurden in gefrorenem Zustand entnommen, gewogen und *einzeln* aufgearbeitet.

Glykogenbestimmung (Gehirn, Herz, quergestreifter Muskel, Leber): Extraktion nach CARROL, LONGLEY und ROE[6] mit kalter 5%iger Trichloressigsäure («Labile Glykogenfraktion» nach STETTEN und STETTEN[7]). Der unlösliche Rückstand wurde mit 30%iger KOH im kochenden Wasserbad extrahiert («Gebundene Fraktion»). Das Glykogen beider Fraktionen wurde getrennt nach Fällung mit Äthanol 96%ig, in 1*n* HCl hydrolisiert. Die Hydrolysate wurden mit NaOH neutralisiert. Die Glykogenbestimmung erfolgte enzymatisch nach HUGGET und NIXON[8] («Wahre Glucose»). Die Glykogenwerte sind in μM Glucose/g Feuchtgewicht angegeben.

Milchsäurebestimmung (Gehirn): Extraktion mit m/3 $HClO_4$; enzymatische Bestimmung nach HORN und BRUNS[9], modifiziert nach GERCKEN[10]. – Milchsäurewerte in μM Milchsäure/g Feuchtgewicht.

ATP, ADP, AMP Bestimmung (Gehirn): ATP nach THORN et al.[11]; ADP und AMP nach LIPMANN[12] und BÜCHER[13]. Werte in μM/g Feuchtgewicht[14].

Ergebnisse. (1) Glykogen. Aus den Figuren 1 und 2 ist zu ersehen, dass der Glykogengehalt/g Feuchtgewicht im Gehirn 2,05 μM, im Herzmuskel 8,59, in der quergestreiften Muskulatur 10,87 und in der Leber 13,24 μM/g beträgt. Diese Normalwerte erfuhren während der 18stündigen Versuchsdauer bei den fastenden Kontrolltieren keine signifikante Änderung.

Schon 1 h nach der Injektion von 5 mg/kg Reserpin ist der Glykogengehalt des Gehirns (Figur 1) signifikant erhöht – von 2,05 auf 2,52 μM/g – und nimmt im Laufe des Versuches kontinuierlich zu. Nach 18 h beträgt er 4,14 μM/g. Das bedeutet eine Zunahme um 100%.

Im Herzmuskel (Figur 2) findet sich 1 und 3 h nach Reserpin eine Erhöhung des Glykogengehaltes um 43%, die jedoch nicht signifikant ist. Nach 12 h ist auch das Glykogen des Herzens signifikant erhöht: von 8,59 auf 16,8 μM/g. Das bedeutet eine Zunahme um 96%.

In der quergestreiften Muskulatur – gesamte Oberschenkelmuskulatur beider Hinterextremitäten – (Figur 2) ist der Anstieg des Glykogengehaltes schon 3 h nach Reserpin signifikant und erreicht, wie im Herzen, nach 12 h das Maximum. Die Zunahme beträgt 93%.

In der Leber (Figur 2) kommt es 1 h nach der Reserpininjektion zu einer geringfügigen – nicht signifikanten – Abnahme des Glykogengehaltes; nach 3 h ist er gegenüber den Kontrollen etwas erhöht (nicht signifikant); nach 12 h

[1] Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.
[2] H. J. KUSCHKE und J. FRANTZ, Arch. exp. Path. Pharmak. *224*, 269 (1955).
[3] K. F. GEY und A. PLETSCHER, Exper. *17*, 25 (1961).
[4] R. A. HOFFMANN, Amer. J. Physiol. *195*, 755 (1958).
[5] L. J. ABOOD und K. L. RAMANCHEK, Ann. N.Y. Acad. Sci. *66*, 812 (1957).
[6] N. V. CARROL, R. W. LONGLEY und J. H. ROE, J. biol. Chem. *220*, 583 (1956).
[7] W. DE STETTEN und M. R. STETTEN, Physiol. Rev. *40*, 505 (1960).
[8] A. ST. G. HUGGET und D. A. NIXON, Biochem. J. *66*, 12 P (1956).
[9] H. D. HORN und F. H. BRUNS, Biochim. biophys. Acta *21*, 378 (1956).
[10] G. GERCKEN, Hoppe-Seyler's Z. *320*, 180 (1960).
[11] W. THORN, G. PFLEIDERER, R. A. FROWEIN und I. Ross, Pflügers Arch. ges. Physiol. *261*, 334 (1955).
[12] F. LIPMAN, Adv. Enzymol. N.Y. *1*, 99 (1941).
[13] TH. BÜCHER, Adv. Enzymol. N.Y. *14*, 1 (1953).
[14] Die für die enzymatischen Tests verwendeten Fermente wurden von der Firma C. F. Boehringer, Mannheim, bezogen.

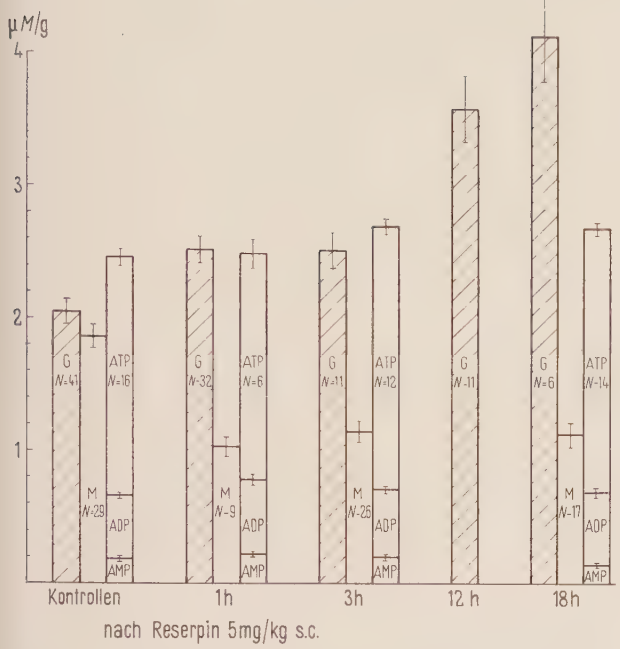


Fig. 1. Einfluss von Reserpin auf den Glykogen-, Milchsäure- und Adenosinphosphatgehalt des Gehirns von Mäusen. G = Glykogen in μM Glucose/g Feuchtgewicht. M = Milchsäure in μM/g. N = Anzahl der Tiere.

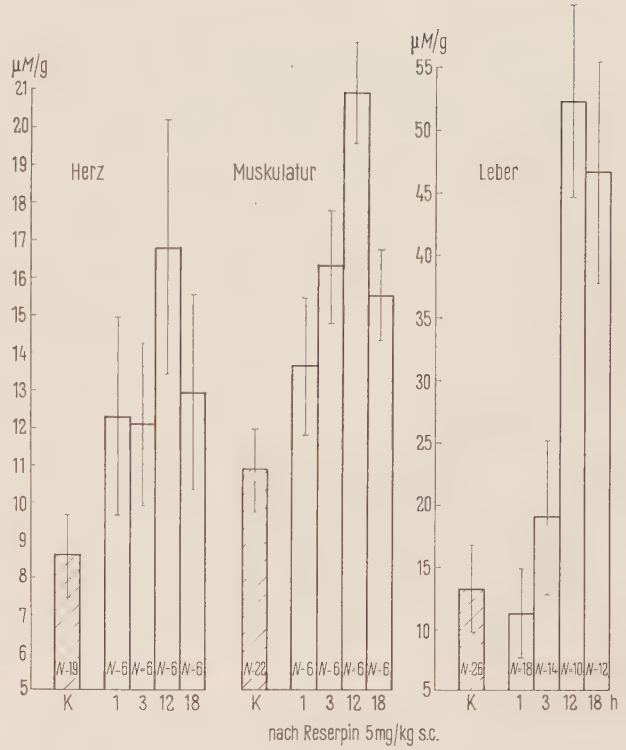


Fig. 2. Einfluss von Reserpin auf den Glykogengehalt des Herzens, der quergestreiften Muskulatur und der Leber (Mäuse). K = Kontrolltiere. N = Anzahl der Tiere.

erreicht er eine maximale Zunahme: von 13,24 auf 52,21 μM/g. Das bedeutet einen Anstieg um 293%.

Die angegebenen Zunahmen des Glykogengehaltes gelten für die mit Trichloressigsäure extrahierbare labile Fraktion («élément variable»). Nur im Gehirn erfuhr auch die mit KOH extrahierbare gebundene Fraktion («élément constant») eine geringfügige Zunahme.

(2) Milchsäure. Der Milchsäuregehalt des Gehirns (Figur 1) hat schon 1 h nach Reserpin signifikant von 1,86 auf 1,02 μM/g, das heisst um 45%, abgenommen und bleibt während der 18stündigen Versuchsdauer unverändert erniedrigt.

(3) ATP. Der ATP-Gehalt des Gehirns (Figur 1) ist 3 und 18 h nach Reserpin geringfügig, jedoch signifikant erhöht; in keinem Fall wurde eine Erniedrigung des ATP-Gehaltes gefunden. Auch die ADP- und AMP-Fraktion ist nach 1 und 3 h etwas erhöht (siehe auch Schwemmle und Heim[15]).

Zur Erklärung der von uns erhaltenen Ergebnisse bieten sich vor allem 2 bekannte Wirkungen des Reserpins an: die Freisetzung von Adrenalin und Noradrenalin[16] aus dem Nebennierenmark und die Stimulierung des Hypophysenvorderlappen-Nebennierenrindensystems[17] mit einer vermehrten Produktion von Corticoiden. – Nach Adrenalin ist der Glykogengehalt der Leber – anfänglich erniedrigt – anschliessend erhöht (Cori[18]), dem entspricht eine langdauernde Abnahme des Muskelglykogens unter Erhöhung der Blutmilchsäure. Nach Reserpin steigt jedoch gleichzeitig mit dem Leberglykogen auch das Muskelglykogen signifikant an, ebenso wie das Herz- und Gehirnglykogen. – Corticoide stimulieren die Glykogenneubildung aus Nicht-Kohlehydraten (Gluconeogenese). Das wesentliche Ergebnis unserer Untersuchungen, *die nach Reserpin in allen Organen erfolgende Zunahme des Glykogengehaltes*, findet somit vielleicht seine Erklärung in einer durch Reserpin ausgelösten Förderung der Gluconeogenese, wobei die Aufklärung der zugrunde liegenden Wirkungsmechanismen und des Zusammenspiels der beteiligten körpereigenen Wirkstoffe weiteren Untersuchungen vorbehalten bleibt.

Summary. In fasted white mice, 1–18 h after the injection of 5 mg/kg Reserpine the glycogen content of brain, heart, skeletal muscle and liver is significantly increased (about 100%, in liver nearly 300%). It is suggested that this is due to an enhanced synthesis of glycogen from non-carbohydrate material.

Concerning the underlying mechanism, it is pointed out that after reserpine there occurs a release of catecholamines from the adrenal medulla and—by stimulation of the anterior pituitary—an enhanced production of corticoids.

Simultaneously with the increase of the brain glycogen, the level of lactic acid is decreased, whereas the ATP-, ADP- and AMP-content of the brain remains practically unaffected.

H. Balzer, P. Holtz und D. Palm

Pharmakologisches Institut der Universität Frankfurt a. M. (Deutschland), 29. März 1961.

[15] K. Schwemmle und F. Heim, Med. exp. *1*, 351 (1959).
[16] M. Holzbauer und M. Vogt, J. Neurochem. *1*, 8 (1956).
[17] H. F. Wells, F. N. Briggs und P. L. Munson, Endocrinology *59*, 571 (1956).
[18] C. F. Cori, Physiol. Rev. *11*, 143 (1931).

Occurrence of Giant Nuclei and Pharyngeal Tumour in the Earthworm *Lumbricus terrestris*

Recently HANCOCK[1] described giant nuclei in the epithelial cells of the pharynx in the earthworm, *Lumbricus* sp., originating from Kansas City. As these nuclei were not observed in specimens obtained from other sources, this is certainly a particular case.

We observed these giant nuclei in the epithelial cells of the pharynx in *Lumbricus terrestris* and were also in a position to study a case of pharyngeal tumour, in which particularly the giant nuclei cells appeared to have grown.

In the pharynx the giant nuclei were observed in a fair number, which decreased towards the oesophagus. Cytometrically the greatest average diameter amounted to 21.2 μ. The greatest average diameter was 5.7 μ in the normal epithelial cells of the pharynx. On the strength of the significant increase in number of chromocentres and in amount of Feulgen-positive material, the giant nuclei have probably to be considered as polyploid. In general the large nucleoli were irregularly shaped, whereas the chromocentres were easily observed.

The pharyngeal tumour was largely composed of cells with giant nuclei showing a distinct polymorphy. Mitotic figures were frequent. In the nuclei of some tumour cells, two or more nucleoli appeared to be present. Also in the giant nuclei of the tumour cells, the chromocentres were much more clearly visible than in normal epithelial cells.

Endoploidy appears to be most highly expressed in gland cells, for instance in the cells of the pharyngeal gland in the worker bee[2]. There is possibly a close relationship between the protein formation of these gland cells and endopolyploidy[3]. In this respect, the increase in heterochromatic regions and in nucleolar organizers may be of fundamental importance. This relationship undoubtedly plays an important part in tumour genesis.

Zusammenfassung. Beschreibung von Riesenkernen und einer Geschwulst des Pharynx bei *Lumbricus terrestris*.

A. STOLK

Department of Histology, Free University, Amsterdam (The Netherlands), March 23, 1961.

1 R. L. HANCOCK, Nature *189*, 685 (1961).
2 M. J. D. WHITE, in *Cytology and Cell Physiology* (Ed. by G. H. BOURNE, second ed., Oxford Univ. Press 1951), p. 183.
3 T. S. PAINTER, J. exp. Zool. *99*, 523 (1945).

Enzymatic Activity (three Dehydrogenase Systems) of the Pharyngeal Tumour in the Earthworm *Lumbricus terrestris*

Recently we studied a pharyngeal tumour in the earthworm, *Lumbricus terrestris*[1]. This tumour mainly consisted of cells with giant nuclei showing a distinct polymorphy and also occurring in the normal pharynx[1,2]. It seemed desirable to us to study this invertebrate tumour histochemically for the three dehydrogenase systems, viz. succinic diphosphopyridine nucleotide (DPN) and triphosphopyridine nucleotide (TPN) diaphorase and the DPN-dependent enzymes: lactic, malic, glutamic, β-hydroxybutyric, and ethanolic dehydrogenases, according to the methods of SELIGMAN, NACHLAS et al.[3–6]. The sections were incubated at 37°C for 15 min, some sections being also processed with Regaud's stain[7] to demonstrate the mitochondria.

The succinic dehydrogenase activity, which was presumably linked to the mitochondria and the cell membranes, appeared to be low in the pharyngeal tumour as compared to that in the normal tissues. On the other hand, the DPN diaphorase activity was high, similar to that in the most intensely stained normal cells. Although this enzyme and the DPN-linked dehydrogenases were linked to the mitochondria and some cell membranes, the TPN diaphorase activity appeared to be much lower than the DPN-diaphorase activity, showing a more finely and widely dispersed intracytoplasmic distribution, which is suggestive of the presence of microsomes, and displayed a high concentration in the cell membranes. The glutamic dehydrogenase activity was found to be only weak in the tumour cells, while the lactic, malic and β-hydroxybutyric dehydrogenase activity was quite high. The malic dehydrogenase activity was less intense than that of the lactic dehydrogenase. In contradistinction to most of the normal tissues, the activity of the ethanolic dehydrogenase could be demonstrated.

As these results, which are given in the Table, are in general in good agreement with those obtained with some human tumours[6] and the renal adenocarcinoma of the oviparous Toothcarp *Aplocheilus lineatus*[8], they are probably of more general importance.

Distribution of succinic dehydrogenase, DPN and TPN diaphorases and several DPN-linked dehydrogenases in the pharyngeal tumour of the earthworm. The enzymatic activity was graded microscopically on the basis of colour reaction in 0 to 4 by inspection of the tumour cells with giant nuclei and with normal nuclei.

Succinic dehydrogenase	1	Malic dehydrogenase[a]	2
DPN diaphorase	4	Glutamic dehydrogenase[a]	1
TPN diaphorase	2	β-hydroxybutyric dehydrogenase[a]	2
Lactic dehydrogenase[a]	4	Ethanolic dehydrogenase[a]	0

[a] DPN-linked dehydrogenases.

Zusammenfassung. Drei Dehydrogenase-Systeme (Succino-, DPN- und TPN-Dehydrogenase sowie einige DPN-ähnliche Dehydrogenasen, wie die auf Milch-, Malon-, Glutamin- und β-Hydroxybuttersäure sowie auf Äthanol wirkenden substrat-spezifischen Dehydrogenasen) wurden an einer Geschwulst des Pharynx des Regenwurmes *Lumbricus terrestris* untersucht.

Die Enzymaktivität war für die DPN- und die Milchsäure-Dehydrogenase sehr hoch; eine mittlere Aktivität zeigten die TPN-, die Malonsäure- und die β-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase. Sehr gering war die Reaktion für die Succino- sowie die Glutaminsäure-Dehydrogenase, während sie für die Äthanol-Dehydrogenase negativ ausfiel.

A. STOLK

Department of Histology, Free University, Amsterdam (The Netherlands), May 2, 1961.

1 A. STOLK, Exper., in press (1961); Proc. Kon. Ned. Akad. Wet., in press (1961).
2 R. L. HANCOCK, Nature *189*, 685 (1961).
3 A. M. SELIGMAN and A. M. RUTENBURG, Science *113*, 317 (1951).
4 K. C. TSOU, C. S. CHENG, M. M. NACHLAS, and A. M. SELIGMAN, J. Amer. chem. Soc. *78*, 6139 (1956).
5 M. M. NACHLAS et al., J. Histochem. *5*, 420 (1957); J. biophys. biochem. Cytol. *4*, 467, pl. 223 (1958), 29, pl. 11 (1958).
6 B. MONIS, M. M. NACHLAS, and A. M. SELIGMAN, Cancer *12*, 1238 (1959).
7 R. D. LILLIE, *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*, 2nd ed. (The Blakiston Company Inc., New York 1954), p. 185.
8 A. STOLK, Naturwiss. *47*, 188 (1960); Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. *63*, 548, 567 (1960).

Die Carbohydrasen der Spinnmilbe *Tetranychus urticae* Koch (*Acari, Trombidiformes, Tetranychidae*)

Über Verdauungsfermente bei Spinnmilben ist bisher in der Literatur nichts bekannt geworden. Diese sehr lebhaften, phytophagen Arthropoden dürften den grössten Teil ihres Betriebsstoffwechsels durch die Verwertung von Kohlenhydraten decken. Darüber hinaus spielt nach den Untersuchungen von FRITZSCHE[1] der Gehalt an reduzierenden Zuckern in den Wirtspflanzen für die Vermehrungsrate der Spinnmilben eine ausschlaggebende Rolle. Eine eingehende Untersuchung und Charakterisierung der kohlenhydratspaltenden Fermente erscheint uns daher gerechtfertigt. Da das Darmsystem von *Tetranychus urticae* präparatorisch nicht zugänglich ist, wurden Homogenisate ganzer Tiere verwendet. Für die Sezernierung von Fermenten dürften bei Spinnmilben lediglich Darm und Speicheldrüsen in Frage kommen. Auf Grund des Saugvorganges, der charakterisiert ist durch das meist vollständige Aussaugen einer grossen Anzahl von Zellen in kleinen Zeiträumen[2], ist jedoch nicht anzunehmen, dass den Speicheldrüsen eine entscheidende Bedeutung als Bildungsort für Carbohydrasen zukommt.

Als Versuchstiere dienten Deutonymphen und weibliche Imagines von *Tetranychus urticae* Koch, die in Laborzuchten (20–22°C und Langtagbeleuchtung) an *Phaseolus vulgaris* L. gehalten wurden. In erster Linie wurden Tiere von überstark befallenen Blättern verwendet, da in Homogenisaten solcher Spinnmilben wenig unabgebautes Chlorophyll und andere pflanzliche Inhaltstoffe auftreten. Die Homogenisate wurden anhand verschiedenartiger Substrate auf das Vorhandensein der entsprechenden Carbohydrasen geprüft.

Methode. 15–20 mg Milben in 40–60 μl 0,9%iger NaCl-Lösung homogenisieren und zentrifugieren. Je 5 μl dieses Extraktes bei 37°C für verschieden lange Zeiten unter Toluoldämpfen mit 5 μl Sörensen-Phosphat-Puffer (pH 6,8), der 100 γ des entsprechenden Substrates enthält, inkubieren. Kontrollen: Substrat + Puffer und Homogenisat + Puffer.

Chromatographische Technik. Nach der Inkubation erfolgte quantitatives Auftragen der Ansätze auf Whatman Nr. 1 Papier. Danach entwickeln im Durchlaufchromatogramm ($2^1/_2$ Tage) mit einem Gemisch aus *n*-Propanol-Äthylacetat-Wasser (7:1:2). Nachweis der Zucker mit acetonischer Silbernitratlösung, Besprühen mit äthanolischer Natronlauge und Auswaschen in 5*n* Ammoniak und Wasser. Das Vorhandensein einer Carbohydrase kann auf dem Papier auf zweierlei Weise nachgewiesen werden: Erstens durch das Auftreten der Spaltprodukte und zweitens durch eine signifikante Verringerung oder ein vollständiges Verschwinden der Substrate.

Stärke wird durch Milbenextrakte in hohem Ausmass gespalten (starke Amylaseaktivität). Nach 16stündiger Inkubationszeit ist das eigentliche Endprodukt Maltose durch die ebenfalls vorhandene starke α-Glucosidase (Maltase) bereits zu Glucose hydrolysiert und deshalb nicht mehr nachweisbar. Die starke α-Glucosidase spaltet weiterhin Saccharose und Trehalose, wobei der Rohrzucker schneller abgebaut wird. Dies erklärt sich vielleicht daraus, dass Saccharose neben der α-Glucosidase auch durch eine β-h-Fructosidase hydrolysiert wird, was im Folgenden noch auszuführen ist. Eine Spaltung des Disaccharids Cellobiose fand nicht statt, eine β-Glucosidase fehlt demnach. Die Galactoside Melibiose und Lactose werden in Galactose und Glucose zerlegt. Die Milben müssen also sowohl eine α- als auch eine β-Galactosidase enthalten; letztere ist wirksamer. Das Trisaccharid Melezitose wird in Glucose und Turanose gespalten. Dieses α-Glucosid wird aber durch die starke α-Glucosidase sehr schnell zu Fructose und Glucose hydrolysiert und kann aus diesem Grunde nicht nachgewiesen werden. Das Trisaccharid Raffinose (Galactose-1(α)-6-Glucose-1(α)-2(β)-Fructose) wird nach 20stündiger Inkubationszeit vollkommen in die drei Monosaccharide aufgespalten. Bei kürzeren Inkubationszeiten (4–10 h) konnte als Zwischenprodukt eindeutig Melibiose nachgewiesen werden. Durch die hier erfolgte Abspaltung von Fructose aus Raffinose ist das Vorkommen einer β-h-Fructosidase bewiesen. Im weiteren Spaltungsverlauf wird dann auch die α-galactosidische Bindung der Melibiose angegriffen. Unter abgeänderten geeigneten Versuchsbedingungen wurde auch das Vorkommen von Polyasen (ausser Amylase) untersucht. Alle Versuche mit den Substraten Cellulose, Pektin und Pektinsäure verliefen negativ; es fehlen Cellulase, Pektinase und Polygalacturonase.

Der Vergleich mit Untersuchungen an Aphiden[3] und Wanzen[4] zeigt eindeutig ein breiteres Carbohydrasen-Wirkungsspektrum bei *Tetranychus urticae*, was in Zusammenhang mit der sehr polyphagen Lebensweise dieser Tiere zu bringen sein dürfte. Das Vorkommen einer Polygalacturonase in den Speicheldrüsen verschiedener Aphiden[5] hängt mit der hier andersartigen, meist interzellularen Stechweise zusammen[6].

Carbohydrasenaktivität in Extrakten aus *Tetranychus urticae*

Substrate	Spaltung durch Carbohydrasen	Spaltprodukte
α-Glucoside		
Stärke	+	Glucose (Maltose)
Maltose	+	Glucose
Saccharose	+	Glucose, Fructose
Trehalose	+	Glucose
β-Glucoside		
Cellobiose	–	–
Cellulose	–	–
α-Galactosid		
Melibiose	+	Glucose, Galactose
β-Galactosid		
Lactose	+	Glucose, Galactose
Trisaccharide		
Melezitose	+	Glucose, Fructose
Raffinose	+	Glucose, Fructose, Galactose
Pektin	–	–
Pektinsäure	–	

Summary. In preparations of crushed whole spider mites (*Tetranychus urticae* Koch), the enzymes capable of hydrolyzing carbohydrates were identified. The products of the enzymic hydrolysis were detected by paper chromatography. The following substrates were hydrolyzed: Starch, maltose, sucrose, trehalose, melibiose, lactose, melezitose and raffinose. Not attacked were: Cellobiose, cellulose, pectin and pectic acid. In the homogenates there must be present an amylase, an α-glucosidase, a β-h-fructosidase, an α- and β-galactosidase. There is no indication for the presence of a β-glucosidase, a cellulase, a pectinase and polygalacturonase.

P. EHRHARDT und G. VOSS

Institut für Angewandte Zoologie der Universität Würzburg (Deutschland), 31. März 1961.

[1] R. FRITZSCHE, Biol. Zbl. *79*, 521 (1960).
[2] R. LIESERING, Z. Pflkrankh. *67*, 524 (1960).
[3] F. DUSPIVA, Verh. Dtsch. Zool. Ges. Tüb. *1954*, 440.
[4] E. HAAS, Diss. Heidelberg (1955).
[5] J. W. MC ALLAN und M. L. CAMERON, Can. J. Zool. *34*, 559 (1956).
[6] Herrn Professor Dr. K. GÖSSWALD sei an dieser Stelle vielmals für die Ermöglichung dieser Untersuchungen und seine freundliche Unterstützung gedankt.

Weitere Untersuchungen über strukturabhängige Wirkungsunterschiede bei Cardenoliden und Bufadienoliden

In einer vorhergehenden Mitteilung[1] haben wir mit Hilfe eines neuen Testes bei 3 Paaren einander entsprechender Genine von Cardenoliden und Bufadienoliden strukturabhängige Wirkungsunterschiede nachgewiesen. Als Versuchsmodell benutzten wir das spontan schlagende isolierte Meerschweinchen-Aurikelpräparat, das durch 2,4-Dinitrophenol (DNP), Chinin und Fluoracetat geschädigt worden war. Die Genine, die in Konzentrationen untersucht wurden, die am ungeschädigten Herzen äquieffektiv waren, zeigten in Abhängigkeit von ihrer Struktur nach Schädigung mit Chinin und Fluoracetat, nicht aber nach 2,4-Dinitrophenol, eine unterschiedlich starke Zunahme der Herzleistung.

Mit derselben Methodik untersuchten wir weitere Stoffwechselinhibitoren und andere herzschädigende Substanzen. Die Ergebnisse sind in den Tabellen I und II zusammengefasst.

[1] W. FÖRSTER, Exper. *17*, 220 (1961).

Tab. I

Art der Schädigung	3,14-Dihydroxy-		3,14,12-Trihydroxy-		3,14,16-Trihydroxy-Verbindungen	
	Digitoxigenin $3 \cdot 10^{-7}$ g/ml	Bufalin $2 \cdot 10^{-8}$ g/ml	Digoxigenin $2 \cdot 10^{-6}$ g/ml	12 β-Hydroxybufalin $5 \cdot 10^{-7}$ g/ml	Gitoxigenin $(3–4) \cdot 10^{-6}$ g/ml	Desacetylbufotalin $(1{,}0–1{,}5) \cdot 10^{-7}$ g/ml
Ohne Schädigung						
Zunahme der Herzleistung	54%	53%	45%	50%	46%	53%
	($n = 104$)	($n = 109$)	($n = 128$)	($n = 92$)	($n = 78$)	($n = 75$)
Butallylonal (= Pernocton)						
Abnahme der Herzleistung	71%	77%	74%	76%	73%	75%
Zunahme der Herzleistung	82%	73%	72%	87%	50%	76%
	(15)	(14)	(14)	(14)	(14)	(14)
Azid						
Abnahme der Herzleistung	73%	72%	70%	73%	76%	75%
Zunahme der Herzleistung	34%	24%	42%	49%	19%	29%
	(16)	(15)	(15)	(15)	(20)	(14)
Jodacetat						
Abnahme der Herzleistung	73%	75%	81%	80%	nicht untersucht	
Zunahme der Herzleistung	—	12%	12%	8%	nicht untersucht	
	(10)	(8)	(12)	(13)		
Mersalyl						
Abnahme der Herzleistung	78%	80%	83%	79%	nicht untersucht	
Zunahme der Herzleistung	46%	58%	39%	25%	nicht untersucht	
	(11)	(10)	(12)	(9)		
Bariumchlorid						
Abnahme der Herzleistung	10%	21%	9%	5%	nicht untersucht	
Zunahme der Herzleistung	13%	8%	9%	24%	nicht untersucht	
	(12)	(15)	(12)	(12)		

Tab. II

Art der Schädigung	3,14-Dihydroxy-		3,14,12-Trihydroxy-		3,14,16-Trihydroxy-Verbindungen	
	Digitoxigenin $3 \cdot 10^{-7}$ g/ml	Bufalin $2 \cdot 10^{-8}$ g/ml	Digoxigenin $2 \cdot 10^{-6}$ g/ml	12 β-Hydroxybufalin $5 \cdot 10^{-7}$ g/ml	Gitoxigenin $(3–4) \cdot 10^{-6}$ g/ml	Desacetylbufotalin $(1{,}0–1{,}5) \cdot 10^{-7}$ g/ml
Fluorid						
Abnahme der Herzleistung	39%	43%	45%	64%	nicht untersucht	
Zunahme der Herzleistung	49%	24%	41%	59%	nicht untersucht	
	(12)	(12)	(9)	(13)		
N-Äthylmaleinimid	← $P < 0{,}01$ →		← $P > 0{,}05$ →			
Abnahme der Herzleistung	35%	31%	17%	31%	31%	29%
	← $P > 0{,}05$ →					
Zunahme der Herzleistung	6%	21%	10%	14%	5%	11%
	(23)	(23)	(12)	(12)	(11)	(11)
Jodacetamid	← $P < 0{,}01$ →		← $P > 0{,}2$ →		← $P > 0{,}2$ →	
Jodacetamid-Eigenwirkung						
Zunahme der Herzleistung	37%	43%	68%	52%	48%	46%
	← $P > 0{,}05$ →					
Geninwirkung						
Zunahme der Herzleistung	–1%	9%	21%	17%	–7%	12%
	(13)	(13)	(14)	(14)	(17)	(11)
Phenylbutazon (Butazolidin)						
Butazolidin $1{,}5 \cdot 10^{-4}$ g/ml						
Abnahme der Herzleistung	77%	77%	80%	82%	79%	80%
Zunahme der Herzleistung	51%	31%	52%	83%	43%	73%
	(16)	(17)	(17)	(17)	(13)	(15)
Butazolidin $3 \cdot 10^{-4}$ g/ml	← $P < 0{,}02$ →		← $P < 0{,}05$ →		← $P < 0{,}02$ →	
Abnahme der Herzleistung	83%	80%	82%	83%	79%	80%
Zunahme der Herzleistung	27%	29%	33%	54%	29%	34%
	(10)	(10)	(10)	(16)	(8)	(8)
	← $P > 0{,}2$ →		← $P < 0{,}01$ →		← $P > 0{,}2$ →	

Die untersuchten 6 Genine zeigen untereinander gegenüber einer Herzschädigung mit Barbiturat, Azid, Jodacetat, Mersalyl und Bariumchlorid (Tabelle I) kein unterschiedliches Verhalten. Die Zunahme der Herzleistung ist je nach Schädigungssubstanz verschieden, am stärksten nach Barbiturat, am schwächsten nach Jodacetat und Bariumchlorid.

Demgegenüber sind zwischen den einzelnen Geninen nach Schädigung mit Fluorid, N-Äthylmaleinimid, Jodacetamid und Phenylbutazon (Tabelle II) deutliche strukturabhängige Wirkungsunterschiede nachweisbar. Bei Fluorid und N-Äthylmaleinimid beziehen sie sich vorwiegend auf die 3,14-Dihydroxy-Verbindungen. Nach Fluorid ist Digitoxigenin stärker wirksam als Bufalin ($P < 0{,}01$), nach N-Äthylmaleinimid wirkt Bufalin stärker als Digitoxigenin ($P > 0{,}001$). Bei Fluoridgabe ist ausserdem 12β-Hydroxybufalin signifikant stärker wirksam als Bufalin ($P < 0{,}001$). Nach Jodacetamid, das in der untersuchten Konzentration einen positiv inotropen Eigeneffekt besitzt – erst höhere Konzentrationen vermindern die Herzleistung – wirken die drei Bufadienolide gleich stark; bei den Cardenoliden ist Digoxigenin dem Gitoxigenin ($P < 0{,}01$) und dem Digitoxigenin ($P = 0{,}05$) überlegen. Nach Schädigung mit Phenylbutazon haben bei den Di- und Trihydroxyverbindungen die Cumalin- und Butenolidrinderivate einen unterschiedlichen Effekt. Digitoxigenin ist dem Bufalin ($P < 0{,}02$), 12β-Hydroxybufalin und Desacetylbufotalin sind ihren entsprechenden Butenolid-Derivaten überlegen ($P < 0{,}01$ bzw. $P < 0{,}02$).

Da bei der vorliegenden Versuchsanordnung der Unterschied in der Wirkung der Genine auch auf einer unterschiedlichen Beeinflussung der Spontanfrequenz beruhen könnte, wurden die Veränderungen der Herzfrequenz und Kontraktionsstärke getrennt berechnet. Strukturabhängige unterschiedliche Effekte der Genine auf die Herzfrequenz waren nur bei Fluoracetat- ($P > 0{,}001$) und bei Fluoridgabe ($P < 0{,}001$) nachweisbar. Der in der früheren Mitteilung berichtete Unterschied nach Fluoracetatschädigung zwischen den 3,14,12-Trihydroxy-Derivaten und den beiden anderen Geninpaaren ist ausschliesslich auf eine unterschiedlich starke Herzfrequenzbeeinflussung zurückzuführen. Legt man der Auswertung nur die Kontraktionsamplituden zugrunde, wirken alle 6 Genine gleich stark. Nach Fluorid dagegen verstärkt die unterschiedliche Beeinflussung der Herzfrequenz die Wirkungsunterschiede zwischen den Geninen.

Nach den bisherigen Erfahrungen können als empfindlichste Schädigungssubstanzen zum Nachweis von Struktur-Wirkungsbeziehungen bei Geninen Chinin und Phenylbutazon empfohlen werden. Beide Verbindungen ermöglichen eine Differenzierung des Einflusses der Hydroxylgruppen und des Lactonringes. Untersuchungen mit Geninen, die verschiedene Substituenten an C_{10} und weitere Hydroxylgruppen besitzen, werden durchgeführt.

Die vorliegenden Befunde gestatten auch ein gewisses Werturteil über die optimal wirksame Konstitution. In der Mehrzahl der Versuche waren die Bufadienolide den Cardenoliden und die 3,14,12-Trihydroxy- den Dihydroxy- und 3,14,16-Trihydroxy-Verbindungen überlegen.

Summary. By means of guinea-pig auricle preparations, which were damaged in some way, it was demonstrated that bufadienolids compensate different model 'insufficiences' more efficaciously than cardenolids; and 3,14,12-trihydroxygenins more efficaciously than 3,14-dihydroxygenins, and even better than 3,14,16-trihydroxygenins.

W. Förster

Institut für Pharmakologie, Medizinische Akademie, Magdeburg (Deutschland), 19. April 1961.

Malignancy *in vivo* of Chick Embryo Cells Infected with Rous Sarcoma Virus *in vitro*[1]

Chick embryo cells infected with Rous sarcoma virus (RSV) *in vitro* form foci of altered cells[2,3] which continue to multiply and release virus and form a new, stable, transformed cell type[4,5]. It was of interest to determine if such cells possessed properties of malignancy *in vivo* independent of their capacity to release RSV which would produce tumors on release into the host tissues of the chicken. It was important therefore to determine the origin of cells in a Rous sarcoma induced by the injection of chick embryo cells which had been exposed to virus *in vitro* and developed the transformation characteristic of virus infection[2–5]. It has been shown by Kosin and Ishizaki[6] that populations of chicken cells can be identified as of male or female origin by their content of sex chromatin, and recent studies by Thiede[7] have demonstrated that by growing human embryonic cells in monolayers on glass coverslips *in vitro* the sex chromatin becomes prominent and permits a ready identification of the sex of the donor embryo by the technique of Barr and Bertram[8]. It was decided, therefore, to apply this technique to determine the origin of cells in Rous sarcomas which had been induced in chicks by the injection of cells transformed by virus *in vitro*.

Tumors were induced in the wing web of 2-month-old, white Leghorn cockerels and pullets by the injection into the wing web of 200 000 pock forming units of Rous sarcoma virus[9] or of 4.8×10^6 chick embryo cells which had been infected *in vitro* with the virus by the methods described by Temin and Rubin[3]. Microscopic examination revealed that over 50% of these cells had undergone the characteristic morphologic transformation induced by the virus[3,5] and could be demonstrated to be releasing virus by the infective center assay technique of Rubin[5]. The tumors produced by the injection of transformed cells appeared earlier and grew more rapidly than those induced by the virus. When the tumors reached a size of approximately 1 to 2 cm in diameter, they were removed from the wing web and the mucinous tumor mass was carefully dissected from the adjacent normal tissue. This tumor mass was digested with trypsin and cell suspensions prepared for cultivation by the methods described[3]. When a good monolayer of cells had grown out on the Petri dishes, the cells were removed with 0.05% trypsin and 600 000 cells inoculated into each of several test tubes containing coverslips and 2 ml of culture medium[3]. Aliquots of the transformed cells used for inoculation of the

[1] This study was supported by a grant from the National Cancer Institute of the National Institute of Health.

[2] R. A. Manaker and V. Groupe, Virology *2*, 840 (1956).

[3] H. M. Temin and H. Rubin, Virology *6*, 669 (1958).

[4] H. M. Temin and H. Rubin, Virology *8*, 209 (1959).

[5] H. Rubin, Virology *10*, 29 (1960).

[6] I. L. Kosin and H. Ishizaki, Science *130*, 43 (1959).

[7] H. A. Thiede, to be published.

[8] M. L. Barr and E. G. Bertram, Nature *163*, 677 (1949).

[9] R. M. Dougherty, J. A. Stewart, and H. R. Morgan, Virology *11*, 349 (1960).

chickens maintained in tissue culture were harvested and inoculated into test tubes containing coverslips. When the cells had formed a moderately heavy sheet, the coverslips were removed from several tubes inoculated with a given tumor cell or transformed cell line, fixed and stained by the method of KLINGER and LUDWIG[10] for microscopic examination.

The percentage of cells containing sex chromatin was determined by examining the cells on several coverslips prepared from each culture, as noted in the Table. The transformed chick embryo cells appeared to be of male origin as they showed sex chromatin in 3.5% of the cells, thus falling within the range of 1.0 to 5.4% which KOSIN and ISHIZAKI[6] had shown to be characteristic of male cells from the base of a growing feather in 3-week-old New Hampshire chickens, whereas female cells showed sex chromatin in from 35 to 52%. In all male or female chickens, the cells cultivated from the tumors induced by the transformed male cells showed the male pattern of sex chromatin, indicating that the tumor was composed mainly of the male donor cells injected. On the other hand, the tumor cells from sarcomas induced by inoculation of virus showed the sex chromatin pattern characteristic of the sex of the host chicken.

These results indicate that chick embryo cells infected with Rous sarcoma virus *in vitro* are malignant and produce sarcomas when introduced into the wing web tissues of the same inbred strain of white Leghorn chickens from which the embryonic tissue was obtained.

Sex Chromatin in Cells

Source of cells			Number of cells counted	% of cells containing sex chromatin
Virus-transformed chick embryo donor cells			200	3.5
Transformed-cell-induced tumor				
	from male	1	200	2.0
		2	200	3.0
		3	200	7.0
		4	200	1.0
	from female	1	200	4.0
		2	200	4.0
		3	200	4.0
		4	200	3.0
Virus-induced tumor				
	from male		300	3.6
	from female		300	43.6

Résumé. Des cultures de cellules d'embryons de poulet mâles infectées avec le virus du sarcôme de Rous sont cancérigènes lorsqu'elles sont inoculées dans l'aile de poulets de la même souche Leghorn ('inbred'). Les sarcômes produits dans l'animal et les cellules transformées en culture ont la même chromatine sexuelle mâle, même si les tumeurs se sont développées dans des femelles. Au contraire, si les tumeurs sont produites par le virus, et non pas par des cellules infectées, la chromatine est du même sexe que l'animal récepteur.

H. R. MORGAN and A. P. ANDRESE

Department of Bacteriology, University of Rochester School of Medicine and Dentistry, Rochester (New York), March 28, 1961.

[10] H. P. KLINGER and K. S. LUDWIG, Stain Technology *32*, 235 (1957).

Effects of Calcium on the Spontaneous Contractions of the Isolated Ventricle of the Snail *Helix pomatia*

During the last decade it has been postulated that calcium ions play an essential part in the development of tension by a muscle by forming a link between electrical phenomena at the fibre membrane (excitation) and the mechanical response (contraction)[1–5]. A second action of calcium is to stabilize an excitable membrane by raising the threshold to stimulation[6–8]. Molluscan hearts do not in general respond to alterations of calcium concentration in the same way as do vertebrate hearts. For example, in the spontaneously contracting frog's heart calcium-rich solutions lead to systolic arrest[9], and calcium-deficient solutions to diastolic arrest[10], whilst in *Helix* the opposite occurs[11]. The effects of calcium on the spontaneous activity of *Helix* ventricular muscle have therefore been examined to see whether calcium has a fundamentally different action in this tissue compared with that in other (particularly vertebrate) heart muscle. The results obtained so far agree in the main with current ideas about the action of calcium, for calcium-rich solutions favour the development of tension and calcium-deficient solutions increase the excitability of the tissue.

Spontaneous contractions of the ventricle were recorded isometrically by a mechano-electric transducer (RCA 5734) after mechanical reduction by a spring-loaded lever. With this system the maximum shortening of the ventricle was never more than 5% of the resting length. Maximum tension was developed during a contraction when the ventricle was stretched to produce a resting tension of 1–2 g. The physiological saline contained (*mM*): Na^+ 85, K^+ 4, Ca^{2+} 9, Mg^{2+} 14, Cl^- 130, HCO_3^- 5.

As the contracting ventricle is sensitive to increases in the tonicity of the saline, the effects of calcium-rich solutions had to be studied in a saline with reduced sodium chloride concentration. These experiments were controlled by others in which the effects of low sodium chloride concentration alone were determined, isotonicity being maintained with sucrose. When the calcium chloride concentration was reduced, isotonicity was maintained by either sodium chloride or sucrose.

The ventricular contraction rate increases as the calcium concentration is decreased, and calcium chloride can usually be omitted from the saline without inhibiting the spontaneous contractions. ('Calcium-free' saline actually corresponds to severe depletion of calcium only as no

[1] L. V. HEILBRUNN, *The Dynamics of Living Protoplasm* (Academic Press Inc., New York 1956).
[2] A. SANDOW, Yale J. Biol. Med. *25*, 176 (1952).
[3] G. B. FRANK, J. Physiol. *151*, 518 (1960).
[4] R. NIEDERGERKE, Exper. *15*, 128 (1960).
[5] C. P. BIANCI and A. M. SHANES, J. gen. Physiol. *42*, 803 (1959).
[6] H. JENERICK and R. W. GERARD, J. cell. comp. Physiol. *42*, 79 (1953).
[7] F. BRINK, Pharmacol. Rev. *6*, 243 (1954).
[8] S. WEIDMANN, J. Physiol. *129*, 568 (1955).
[9] S. RINGER, J. Physiol. *4*, 29 (1883).
[10] G. R. MINES, J. Physiol. *46*, 188 (1913).
[11] L. HOGBEN, Quart. J. exp. Physiol. *15*, 263 (1925).

special precautions were taken to remove the last traces of this ion from the other salts used in the saline, or from saline adhering to the preparation when the solutions were changed). The relationship between maximum tension developed during a contraction, the contraction rate, and low-calcium concentrations is shown in Figure 1. The response is similar whether isotonicity is maintained by sodium chloride (Figure 1 a) or by sucrose (Figure 1 b), indicating that neither the small increase in sodium concentration in the one nor the reduction in total chloride concentration in the other has any intrinsic effect. The increase in the contraction rate is due to a shortening of the diastolic period; the rates of rise and of decay of tension remain unchanged.

In calcium-free saline the diastolic tone increases (contracture), but contractions were inhibited in only one preparation. Possibly the calcium remaining in the bath is sufficient to preserve contractility. It has been shown that only a small amount of calcium is needed in the solution bathing a frog's muscle to enable it to develop tension[3]. A second factor may be the very high intracellular calcium concentration ($> 100\ mM$)[12].

Increasing the calcium concentration at the expense of sodium leads to an increase in the maximum tension developed during each contraction, and at very high calcium concentrations (36–45 mM) to a decrease in the contraction rate. The relationship between contraction rate, tension, and excess calcium concentration is shown in Figure 2. The effect of low sodium concentrations alone is to produce a slowing of the contraction rate, but no increase in tension; often the contractions become irregular, and at very low sodium concentrations they may be inhibited altogether.

Calcium can compensate for moderate decreases in sodium concentration. It was regularly observed that with the calcium concentration increased to 18 mM, and the sodium concentration reduced by 27 mM, no decrease in contraction rate was seen, although a similar reduction of sodium concentration alone did lead to a decreased contraction rate. At higher calcium concentrations a decrease in rate was observed, which could be due to either the damping effect of calcium on the excitability of the tissue, or to the calcium being unable to completely compensate for the simultaneous decrease in sodium concentration. It was not possible to positively distinguish between these two possibilities, but none of the irregularities of the contractions that frequently accompany a change to low sodium concentrations alone were seen if the calcium concentration was raised simultaneously.

The shape of the recorded contraction alters as the calcium concentration is raised. Contractions recorded from a preparation in normal saline and in saline with 45 mM calcium are shown in Figure 3. The two types of contraction differ in that (a) the rate of rise of tension is greater in the calcium-rich saline, being in this instance 1.25 g/sec compared to a rate of 0.97 g/sec in normal saline, and (b) the relaxation time is longer in calcium-rich saline (6.6 sec compared to 4.3 sec in normal saline).

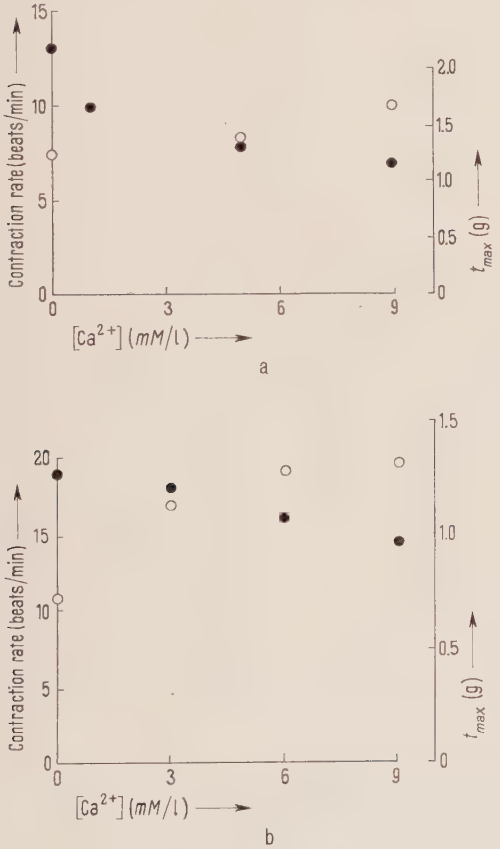


Fig. 1. The relationship between low-calcium concentrations, contraction rate and the maximum tension of each contraction (t_{max}). (a) Tonicity maintained with sodium chloride (3 mM NaCl for every 2 mM decrease in $CaCl_2$). (b) Tonicity maintained with sucrose. Closed circles show the contraction rate and the open circles the tension.

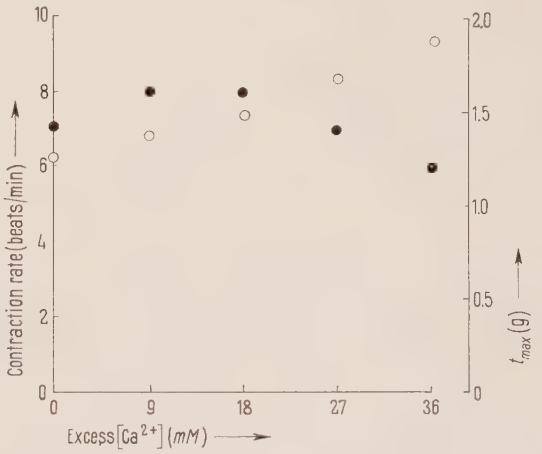


Fig. 2. The relationship between excess calcium concentration (normal is 9 mM), contraction rate and maximum tension of each contraction (t_{max}). Isotonicity preserved by reducing the sodium chloride concentration by 3 mM for every 2 mM increase in calcium chloride concentration. Closed circles show the contraction rate and open circles the tension.

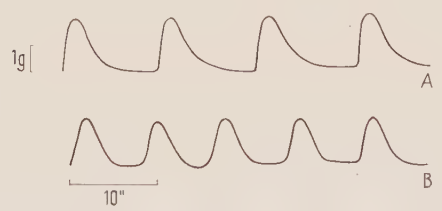


Fig. 3. The shapes of contractions recorded from a ventricle in A, saline with 45 mM Ca^{2+} and 31 mM Na^{+}, and B, normal saline. Tracing of original record; isometric recording.

[12] M. Florkin and G. Duchâteau, C. R. Soc. Biol. *144*, 1132 (1950).
[13] H. C. Lüttgau and R. Niedergerke, J. Physiol. *143*, 486 (1958).

The difference in the response of frog and snail hearts to variations in calcium concentration does not seem to be due to a fundamental difference in the action of calcium on the respective myocardia. The effect of calcium on both contraction rate[10] and strength of contraction[13] in the frog is similar to that in *Helix*. The only striking difference is in the effects of calcium on the 'tone' of the heart.

In an electrically driven frog ventricle increases in calcium concentration are not followed by increases in resting tension, but the peak tension of the contraction is increased and the contraction is prolonged[13]. In the spontaneously contracting frog heart the increase in 'tone' is due to fusion of succeeding contractions. In *Helix* ventricle the contractions never fuse. The simultaneous decrease in contraction rate is sufficient to keep each contraction separate.

According to the hypothesis of JULLIEN et al.[14–16] the action of calcium in *Helix* ventricle is to stabilize the muscle fibre membrane by promoting the binding to the membrane of an unknown compound in an oxidised state that is an intermediary in the oxidative metabolism of the cell, and which has an inotropic effect when released into the perfusion fluid where it is reduced. With calcium-rich solutions the compound is firmly bound to the membrane and the inotropic action is absent, leading to 'diastolisation'. This action is antagonised by potassium, so that with low-calcium concentrations the action of potassium predominates, causing release of the compound and leading to 'systolisation'.

This hypothesis fails to account for the increase in tension with high-calcium concentrations which do not produce total failure, and for the fact that it is the resting tone that is increased by calcium-deficiency (contracture), whilst the individual conctractions are usually smaller. An alternative explanation is that calcium-rich solutions decrease the excitability of the membrane by hyperpolarizing it, causing the contraction rate to be reduced. The second (and independent) action of calcium is an inotropic one and is seen as long as spontaneous contractions persist. With calcium-deficient solutions the reverse would occur. A degree of depolarisation might be produced, making the membrane more excitable, and also producing contracture.

In the frog, low-calcium concentrations abolish contractility, electrical potentials still being recorded when contractions have ceased[10]. Thus if the myocardium is completely unable to contract no contracture is possible.

It seems that a higher concentration of calcium is needed to preserve contractility in the frog heart than in *Helix* ventricle. The high intracellular concentration of calcium in *Helix* ventricle might help to preserve contactility under conditions of severe calcium depletion.

Zusammenfassung. Untersuchungen über den Einfluss von Veränderungen der Calciumkonzentration auf die spontane *Helix*-Herzkammertätigkeit weisen darauf hin, dass Calcim hier keine Wirkung ausübt, die von seiner Wirkung auf Muskelgewebe im allgemeinnen grundverschieden ist. Hochkonzentrierte Calciumlösungen steigern die Kontraktionsspannung und bei höchsten Konzentrationen kann die Muskelerregbarkeit abnehmen, während schwachkonzentrierte Calciumlösungen die Muskelerregbarkeit erhöhen.

D. H. PAUL

Department of Zoology and comparative Physiology, University of Birmingham (England), April 21, 1961.

[14] J. RIPPLINGER and M. JOLY, C. R. Soc. Biol. *149*, 969 (1955).
[15] A. JULLIEN, J. RIPPLINGER, and M. JOLY, Ann. Sci. Univ. Besançon, 2e série, fasc. 5, 67 (1956).
[16] J. RIPPLINGER, Ann. Sci. Univ. Besançon, 2e série, fasc. 8, 3 (1957).

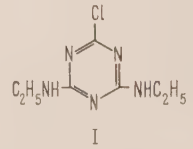
Beitrag zur Kenntnis der Resistenzphänomene einzelner Pflanzen gegenüber dem phytotoxischen Wirkstoff Simazin

Die phytotoxischen Verbindungen vom Typ des Simazins, 2-Chlor-4,6-bis-äthylamino-s-triazin,

zeichnen sich durch eine ausgeprägte Wirkungslücke gegenüber Mais und verwandten Pflanzen aus und sind daher hervorragend zum selektiven Einsatz in dieser Kultur geeignet[1]. Es konnte gezeigt werden[2], dass Maispreßsaft befähigt ist, Simazin auf noch nicht genau abgeklärte Art abzubauen. Als Endprodukt des Abbaus in der intakten Maispflanze konnte in mit radiomarkiertem Simazin ausgeführten Versuchen Kohlendioxyd nachgewiesen werden, das den Tracer-Ringkohlenstoff enthielt[3,4].

Da der Maispreßsaft nach zweistündigem Erhitzen auf 80°C mit Simazin nicht mehr reagiert, schloss man zunächst auf eine enzymatische Natur dieses abbauenden Prinzips. Später konnte dann aber mittels eines Arbeitsganges, der die pflanzlichen Phenole erfassen sollte, aus Maispreßsaft eine Fraktion isoliert werden, die *in vitro* mit Simazin zu reagieren vermochte[5].

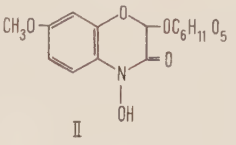
Nach längerem Stehen dieser Fraktion, die im Papierchromatogramm schon recht einheitlich erschien, schied sich ein Kristallisat ab, das durch Umkristallisation aus Methanol in schwach rosa gefärbte Prismen übergeführt werden konnte. Diese wiesen die folgenden Eigenschaften auf: (a) Schmelzpunkt: 159–162°C (Zers.). (b) Analyse[6]: gef. C: 50,99%; H: 4,47%; N: 6,59%; OCH_3: 14,69%. Für $C_9H_9NO_5$ ber. C: 51,18%; H: 4,30%; N: 6,63%; OCH_3: 14,70%. (c) Papierchromatographie: Whatman No. 4; absteigend; $FeCl_3$ als Entwicklungsreagens. Lösungsmittelgemisch: *n*-Butanol:Essigsäure:Wasser = 8:2:2, Rf-Wert: 0,83, Färbung: violett; Lösungsmittelgemisch: *n*-Propanol:NH_3(25%) = 7:3, Färbung: keine. (d) UV-Spektrum[6]: Lösung von 10 μg Substanz/ml Wasser: λ_{max} 262,5 mμ. (e) UV-Spektrum nach Kochen in Wasser[6]: Lösung von 10 μg Substanz/ml Wasser: λ_{max} 227,5 und 286,0 mμ.



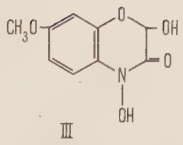
I

[1] A. GAST, E. KNÜSLI und H. GYSIN, Exper. *12*, 146 (1956).
[2] W. ROTH, C. R. Acad. Sci. *245*, 942 (1957).
[3] M. MONTGOMERY und V. H. FREED, Res. Prog. Report, Western Weed Control Conference, p. 93 (1959).
[4] M. T. H. RAGAB und J. P. Mc COLLUM, Weeds *9*, 72 (1961).
[5] W. ROTH, *Recherches sur l'action sélective de substances herbicides du groupe des triazines*, Thèse Université de Strasbourg (1958), im Druck.
[6] Wir danken dem Analytischen Laboratorium der J. R. Geigy AG. für die Ausführung dieser Bestimmungen.

Bei der Durchsicht der Arbeiten über die Isolierung von Inhaltsstoffen des Mais lenkte sich unsere Aufmerksamkeit auf eine kürzlich von VIRTANEN et al.[7–13] bearbeitete Substanzgruppe. Ausgehend von der fungiziden Aktivität des Benzoxazolons[7] sowie des 6-Methoxybenzoxazolons[8], isoliert aus Roggen bzw. Mais und Weizen, fanden sie, dass diese Körper in Wirklichkeit Artefakte sind. Die in den Pflanzen vorkommenden Prekursoren sind Glucoside, denen die Konstitution (II) zukommt. Durch Enzymeinwirkung bildet sich beim Zerstören des pflanzlichen Gewebes das entsprechende Aglucon (III), das unter Hitzeeinfluss in das Benzoxazolon (IV) übergeht[9–12]:

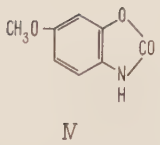


II



III

2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-on



IV

6-Methoxybenzoxazolon

Die oben aufgezählten Charakteristika der von uns aus Mais isolierten, offensichtlich mit Simazin (I) interferierenden Substanz $C_9H_9NO_5$ lassen auf Identität mit (III) schliessen.

Die Fähigkeit dieses 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-ons (III), mit Simazin (I) reagieren zu können, wurde in folgendem Versuch bestätigt: 2,5 mg der Verbindung III wurden in 10 ml Phosphatpuffer pH 3,6 (0,15 m) gelöst und mit 0,1 mg Simazin, das seinerseits in 25 ml Wasser gelöst war, versetzt. Nach viertägigem Aufbewahren des Reaktionsgemisches im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde das unveränderte Simazin mit Chloroform extrahiert, mit Schwefelsäure zu Hydroxy-Simazin hydrolysiert und die Extinktion des Kations dieser Substanz bei 240 mμ gemessen[6]. Es konnten nur noch 15% des eingesetzten Simazins aufgefunden werden. Demgegenüber war im entsprechenden Kontrollversuch ohne Zugabe von (III) noch sämtliches Simazin unverändert vorhanden.

Gleiche Umsetzungsraten wurden auch erhalten, wenn an Stelle von 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-on das 2,4-Dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-on oder die beiden entsprechenden Glucoside eingesetzt wurden[14]. Verbindungen vom Typ der Benzoxazolone (IV), wie sie durch Erhitzen der 2,4-Dihydroxy-benzoxazinone entstehen, vermögen mit Simazin nicht zu reagieren; die eingangs erwähnte Hitzeempfindlichkeit der Abbauaktivität des Maispreßsaftes findet damit ihre Erklärung.

VIRTANEN fand in den Pflanzen Glucosidgehalte von Promille-Grössenordnung[13]; demgegenüber liegen die in den Pflanzen gefundenen Simazinmengen in der Grössenordnung eines hundertstel Promilles, so dass das in den Abbauversuchen eingesetzte Verhältnis ungefähr dem natürlichen entsprechen dürfte.

Die genauen Zusammenhänge der Interferenz von Simazin und ähnlichen Verbindungen mit Substanzen vom Typ II und III bedürfen noch weiterer Abklärung. Widerspruchsvoll erscheint zunächst die Tatsache, dass Substanzen vom Typ II und III auch aus Pflanzen wie Weizen und Roggen isoliert wurden, die gegen Simazin relativ empfindlich sind. Abgesehen davon, dass ihr Gehalt unter den einzelnen Pflanzenspecies und sogar Sorten variieren kann und sich auch mit dem Entwicklungsstadium der Pflanzen ändert[13], zeigen zum Beispiel neuere Untersuchungen, dass der Mais seine aussergewöhnliche Resistenzfähigkeit gegenüber Simazin nicht nur der Fähigkeit, diesen Wirkstoff abzubauen, verdankt. Diese ist auch andern Pflanzen eigen[4,15,16]. Als weiterer wichtiger Faktor wurde aber gefunden, dass der Mais in manchen Fällen relativ weniger Simazin aufnimmt als andere Pflanzen[5,15]; so dürfte ein günstiges Verhältnis der Menge des vorhandenen abbauenden Systems zur aufgenommenen Menge des abzubauenden Substrates das Auftreten phytotoxischer Konzentrationen verhindern. Ferner scheint es, dass noch weitere, anders geartete physiologische Systeme existieren, die eine Resistenz gegenüber Triazinherbiziden bedingen können. Untersuchungen in diesen Richtungen sind im Gange.

Summary. 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (III), isolated from corn sap, detoxifies the herbicide Simazine, 2-chloro-4,6-bis-ethylamino-s-triazine, *in vitro*. 2,4-Dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one and the corresponding natural precursors of it and of (III), glucosides, behave in the same manner. It is very likely, therefore, that these glucosides and aglucones play a role in the resistance phenomena of some plant species against Simazine and related phytotoxic compounds. 6-Methoxybenzoxazolone and benzoxazolone, derived from the abovementioned benzoxazinones by heating, do not interfere with Simazine.

W. ROTH und E. KNÜSLI

Wissenschaftliche Laboratorien der J. R. Geigy A.G., Basel, 14. April 1961.

[7] A. I. VIRTANEN und P. K. HIETALA, Acta chem. scand. *9*, 1543 (1955).
[8] A. I. VIRTANEN, P. K. HIETALA und O. WAHLROOS, Suomen Kemist. *B 29*, 143 (1956).
[9] O. WAHLROOS und A. I. VIRTANEN, Acta chem. scand. *13*, 1906 (1959).
[10] A. I. VIRTANEN und P. K. HIETALA, Acta chem. scand. *14*, 499 (1960).
[11] P. K. HIETALA und A. I. VIRTANEN, Acta chem. scand. *14*, 502 (1960).
[12] E. HONKANEN und A. I. VIRTANEN, Acta chem. scand. *14*, 504 (1960).
[13] A. I. VIRTANEN, Angew. Chemie *70*, 544 (1958).
[14] Wir sind Herrn Prof. A. I. VIRTANEN für die freundliche Überlassung von Mustern dieser Substanzen zu grossem Dank verpflichtet.
[15] D. E. DAVIS, H. H. FUNDERBURK, jr., und N. G. SANSING, Weeds *7*, 300 (1959).
[16] T. J. SHEETS, Weeds *9*, 1 (1961).

Electronmicrographs on the Plastids in the Root of *Azolla imbricata*

Plastid-structures of higher plants have been previously investigated in detail with the light microscope as well as with the electron microscope. As to the chloroplasts of higher plants, it is generally recognized that they consist of the grana, which contain the pigment, and of a colourless stroma[1]. However, in the chloroplasts of lower plants, e.g. some algae (*Euglena, Chlamydomonas, Chlorella, Spirogyra, Nitella,* and *Fucus*)[2,3], the defined grana structures are not observed, but the lamellae are fairly well ordered[3].

[1] E. STEINMANN and F. S. SJÖSTRAND, Exp. Cell Res. *8*, 15 (1955).
[2] D. VON WETTSTEIN, Hereditas *43*, 303 (1957).
[3] A. J. HODGE, J. D. MCLEAN, and F. V. MERCER, J. biophysic. biochem. Cytol. *1*, 605 (1955).

Fig. 1. Central area of the root cells. × 12 000.

Fig. 2. A plastid which has lamellae and grana-*like* structures but no starch grain. × 28 000.

Fig. 3. Three plastids which contain starch grains and one which does not. × 35 000.

p = plastid, pp = proplastid, gls = grana-*like* structure, st = starch grain, m = mitochondrion, pm = plasma membrane, cw = cell wall, is = intercellular space.

In the present investigation, with the electron microscope the author studied the structure of plastids in the root cells of an aquatic fern species, *Azolla imbricata* Nakai; and it was revealed that the plastids in the root of this fern are of a chloroplast nature: the internal structure, especially, exhibits the grana-*like* structure which is assumed to be an intermediate structure between those of higher and lower plants.

The roots were fixed by 1% osmic tetraoxide solution buffered to pH 7.4 with veronal-acetate, embedded by methacryl resin (butyl-methacrylate 8: methyl-methacrylate 2), sectioned with glass-knives by a JUM-type microtome, and photographed with a JEM-5G type electron microscope.

Almost all plastids have a structure of a chloroplast nature, i.e. a lamellar and grana-*like* structure (Figures 1–3). In Figure 2 a typical one is presented: its boundary membrane is of double structure; several parallel lamellae of double structure are observed as the internal structures; some piles of the grana-*like* structure are located here and there on the lamellae; in the stroma are observed some spherical bodies of high electron density having the appearance of carotenoid-*like* pigments. These structural features of chloroplast (lamellae and grana-*like*), on the basis of the observations made in this investigation, are therefore rightly considered to be an intermediate structure between those of higher and lower plants.

As to the question of the origin and development of the plastid structure (lamellae and grana), the following contradictory observations have been previously reported: (1) on the one hand, the grana are differentiated after formation of the lamellae (WETTSTEIN[2], HODGE[4]), and (2) on the other, precisely the opposite opinion (MÜHLETHALER et al.[5]). In the case of the chloroplasts found in the roots of this fern, the grana-*like* structures seem to be differentiated after formation of the lamellar structures.

Figure 1 shows the central portion of one root near the tip where the cells are in the more undifferentiated state. Plastids in various developmental stages can be observed in each cell. The young undifferentiated plastids of simpler structure consist of only 2 or 3 lamellae (Figure 1). They would be regarded as the typical proplastids by MÜHLETHALER et al.[5] and BOPP-HASSENKAMP[6], although there are some opposing arguments by several investigators as to the proper definition of proplastid.

Some, but not all, of the plastids contain starch grains (Figures 1 and 3). The one shown in Figure 3 is filled with large grains. Such plastids may be called amyloplasts? They also clearly possess the lamellar and grana-*like* structure. Therefore, they have the appearance of both amyloplasts and chloroplasts. Herein they are called chloroplasts tentatively: only the plastids, in which starch grains are included and other structural elements cannot be positively recognized, are called amyloplasts.

It should be noted further that the plastids of the roots of this fern are all of a chloroplast nature and some of them seem to have the functions both of photosynthesis (proper only to chloroplasts) and of starch reservoirs (proper only to amyloplasts). The roots of higher plants normally lack the function of photosynthesis; i.e., they have not chloroplasts: the plastids of their roots include proplastids, leucoplasts and amyloplasts.

However, since the fern studied here always floats on the water, it seems very likely that the roots suspended as they are in the water are accessible to light and would possess the function of photosynthesis. The light microscope reveals furthermore that almost all plastids are yellowish-green, like the ordinary chloroplasts, and that they react positively to I_2-KI as well as to Lillie's polysaccharide staining. It may be supposed, therefore, that there might be some relationship between the grana-*like* structure and the starch-containing power of the chloroplasts and the above-mentioned habitat.

Zusammenfassung. Alle Plastiden in den Wurzelzellen von *Azolla imbricata* erweisen sich elektronenmikroskopisch als von Chloroplastiden-Natur. Sie zeigen granenartige Strukturen und enthalten zum Teil Stärkekörner.

In einigen Zellen der Wurzelmitte werden auch Proplastiden festgestellt.

S. KAWAMATU

Biological Institute, Aichi Gakugei University, Okazaki (Japan), February 15, 1961.

[4] A. J. HODGE, J. biophysic. biochem. Cytol. *2*, 597 (1956).
[5] K. MÜHLETHALER and A. FREY-WYSSLING, J. biophysic. biochem. Cytol. *6*, 507 (1959).
[6] G. BOPP-HASSENKAMP, Z. Naturforsch. *15b*, 91 (1960).

The Action of a Phenothiazine Derivative on Enzymes of the Pentose Phosphate Pathway[1]

Phenothiazine derivatives have been implicated as inhibitors of many enzyme systems[2-4]. It has also been observed that they are inhibitors of human erythrocyte metabolism in the presence of methylene blue[5], presumably by inhibiting an enzyme of the pentose phosphate pathway. The present report extends the observations on the pentose pathway by studying the effect of phenothiazine derivatives on glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD) in human erythrocytes.

Blood from healthy donors was collected in tubes containing heparin. The cells were washed three times with 0.14 *M* NaCl and packed by centrifugation after each washing. They were subsequently taken up in distilled water and hemolyzed by alternate freezing and thawing. This preparation was used as a source of enzymes and was prepared fresh daily. All operations were carried out at 4°. Oxidation of glucose-6-phosphate (G-6-P) and 6-phosphogluconate (6-PG) was followed by conventional Warburg techniques[6].

Observations showed that the phenothiazine derivative (thioperazine) exerted an inhibitory effect when either G-6-P or 6-PG was used as substrate (Table I). Preincubation of the phenothiazine with the enzyme at 27° for 30 min prior to the addition of G-6-P or triphosphopyridine nucleotide (TPN) increased the inhibition. TPN, on the other hand, when preincubated with the phenothiazine partially protected the enzyme system against inhibition. In those cases where 6-PG was used as substrate, the results obtained on preincubation were equivocal and are still under investigation.

The TPN effect was further studied by varying the TPN concentration in the system. It can be noted from Table II that an increase in the TPN concentration had a significant effect on the inhibition produced by the phenothiazine. For example, a system containing 0.46 μmoles of TPN in the presence of a constant amount of phenothiazine resulted in an inhibition of 49% of the G-6-PD activity, whereas 1.84 μmoles of TPN decreased the inhibition to 19%.

Tab. I. Effect of thioperazine[a] on G-6-PD activity

Conditions	% Inhibition (range)
No preincubation	31–33
Preincubation 30 min with inhibitor	49–59
Preincubation 30 min with inhibitor plus TPN	28–38

Assay System: 0.10 ml hemolyzate; 0.50 ml glycylglycine buffer, pH 7.4; 0.31 μmoles methylene blue; 40 μmoles $MgCl_2$; 0.92 μmoles TPN; 15 μmoles G-6-P; 1.5 μmoles phenothiazine. Total vol. 3.0 ml.

[a] This particular phenothiazine used because of its solubility at pH 7.4.

[1] Supported by the Nebraska Fund for Psychiatric Research.
[2] J. BERNSOHN, I. NAMAJUSKA, and L. S. G. COCHRANE, Arch. Biochem. Biophys. *62*, 274 (1956).
[3] A. S. MORACZEWSKI and K. P. DUBOIS, Arch. int. Pharmacodyn. *120*, 201 (1959).
[4] E. W. HELPER, M. J. CARVER, H. P. JACOBI, and J. A. SMITH, Arch. Biochem. Biophys. *76*, 354 (1958).
[5] M. J. CARVER and N. ROESKY, Exper. *15*, 138 (1959).
[6] F. M. HUENNEKENS, L. LIEU, H. A. P. MYERS, and B. W. GABRIO, J. biol. Chem. *227*, 253 (1957).

The results reported confirm previous studies on the intact erythrocyte. In addition, it is now possible to be more specific regarding the enzyme systems involved. Inhibition was noted when either G-6-P or 6-PG was used as substrate. Since preincubation favors increased inhibition, it would appear, at least in the case of G-6-PD, that the phenothiazine blocks sites necessary for the action of the enzyme. By preincubating in the presence of TPN the inhibition is decreased, suggesting the preferential affinity of the apoenzyme for the TPN, thus preventing the enzyme-phenothiazine interaction. Alternatively, it is also possible that TPN forms a complex with the phenothiazine, thus preventing its binding to the apoenzyme.

It has been previously reported[7] that TPN stabilizes partially purified G-6-PD from erythrocytes. More recently, MARKS et al.[8] have presented evidence to indicate that TPN or G-6-P protects purified G-6-PD against inactivation by heat. The latter authors suggest that the substrate and coenzyme are important to the stability of the enzyme structure. In view of this, it is conceivable that phenothiazine inhibits the enzyme by influencing the TPN-enzyme interaction.

Similar findings have been reported in studies of other coenzymes. LASSLO and MEYER[9] have reported a phenothiazine-enzyme complex with the *D*-aminoacid oxidase system and point to the structural analogy between the *N*-alkyl substituted phenothiazine and the *N*-ribityl substituted isoalloxazine moiety of flavin adenine dinucleotide (FAD), the coenzyme for this system. In addition, YAGI et al.[10] have demonstrated the formation of complexes of chlorpromazine and flavins. They suggest that such an effect may have important *in vivo* significance, particularly in view of previous work which indicated that modifications in electroencephalogram patterns induced by chlorpromazine could be reversed by FAD[11].

Tab. II. Effect of TPN concentration on inhibition of Glucose-6-phosphate dehydrogenase

TPN (μmoles)	% Inhibition
0.46	49
0.92	42
1.38	30
1.84	19

Phenothiazine Concentration 1.5 μmoles. Assay: same as under Table I.

Résumé. La thiopérazine, qui est un derivé de la famille de la phénothiazine, a le pouvour d'inhibition sur l'activité du glucose-6-phosphate déhydrogénase et du 6-phosphogluconate déhydrogénase dans les globules rouges. Ce pouvoir est modifié si on ajoute du TPN dans le système enzymatique. Le degré de cette modification correspond à la dose de TPN employée.

M. J. CARVER, JOY D. MARKS, and NADINE ROESKY

Nebraska Psychiatric Institute and Department of Biochemistry, University of Nebraska College of Medicine, Omaha, March 21, 1961.

[7] H. N. KIRKMAN, Nature *184*, 1291 (1959).
[8] P. A. MARKS, A. SZEINBERG, and J. BANKS, J. biol. Chem. *236*, 10 (1961).
[9] A. LASSLO and A. L. MEYER, Nature *184*, 1922 (1959).
[10] K. YAGI, T. OZAWA, and T. NAGATSU, Biochim. biophys. Acta *43*, 310 (1960).
[11] K. YAGI, T. OZAWA, M. ANDO, and T. NAGATSU, J. Neurochem. *5*, 304 (1960).

Étude cytochimique des groupes sulfhydriles au cours des modifications de la détermination embryonnaire chez l'œuf de l'oursin *Paracentrotus lividus*

Le développement de l'œuf d'oursin est gouverné par les relations mutuelles et compétitives entre un gradient animal et un gradient végétal[1]. L'équilibre entre ces deux gradients peut être modifié expérimentalement par des méthodes opératoires ou par l'action d'agents chimiques appropriés, avec comme conséquence l'extension des structures entomésodermiques (végétalisation) ou ectodermiques (animalisation).

Nous nous proposons d'examiner et de comparer la distribution des groupes sulfhydriles dans les embryons végétalisés, animalisés et témoins. Les considérations suivantes font ressortir l'intérêt de l'étude des groupes sulfhydriles au cours des modifications expérimentales de la détermination embryonnaire. L'animalisation est en effet provoquée par certaines substances capables de réagir avec les groupes sulfhydriles telles que l'acide *o*-iodosobenzoïque[2], un dérivé organique du mercure, le Salyrgan[3], ainsi qu'un dérivé sulfhydrilé, l'acide thiomalique[4]. D'autre part, l'animalisation et la végétalisation interfèrent avec les gradients de réduction mis en évidence par CHILD[5] et HÖRSTADIUS[6] au cours du développement embryonnaire; ces gradients peuvent correspondre à une répartition inégale de substances réductrices parmi lesquelles on peut considérer les dérivés sulfhydrilés[7].

Méthodes. Les œufs de l'oursin *Paracentrotus lividus* sont utilisés dans ces expériences. Les œufs fécondés et lavés sont divisés en trois groupes. L'un de ces groupes constitue les embryons témoins que l'on fixe à la fin de la gastrulation, au moment de la formation du mésenchyme secondaire. L'animalisation est provoquée en traitant les œufs fécondés par une solution contenant 0,004% de chlorure de zinc dans l'eau de mer[8]. La végétalisation est obtenue en traitant les œufs fécondés par une solution de chlorure de lithium à la concentration 0,026 *M*. Après 24 h les embryons sont enlevés des solutions, lavés et reportés dans l'eau de mer normale où ils poursuivent leur développement pendant 20 h. Toutes les cultures sont faites à la température du laboratoire. Les embryons animalisés sont des blastulas hyperciliées présentant une extension considérable de l'épaississement apical ectodermique et de la touffe ciliée apicale. L'archentéron n'est pas formé; quelques cellules mésenchymateuses sont situées au pôle végétal. Les embryons végétalisés sont caractérisés par une énorme vésicule entodermique à parois épaisses et par une petite vésicule ectodermique à parois minces. Des cellules mésenchymateuses et des cellules pigmentaires sont réparties dans le blastocèle.

[1] J. RUNNSTRÖM, Roux' Arch. *113*, 556 (1928).
[2] J. RUNNSTRÖM et G. KRISZAT, Exp. Cell Res. *3*, 497 (1952).
[3] R. LALLIER, C. R. Acad. Sci. *250*, 3380 (1960).
[4] R. LALLIER, Exper. *8*, 271 (1952).
[5] C. M. CHILD, Roux' Arch. *135*, 426 (1936).
[6] S. HÖRSTADIUS, J. exp. Zool. *129*, 249 (1955).
[7] S. BÄCKSTRÖM, *Reducing Agents and Activities in Sea Urchin Development* (Almqvist and Wiksells, Boktryckeri AB., Uppsala 1959).
[8] R. LALLIER, Arch. Biol. *66*, 75 (1955).

Les embryons sont fixés pendant 12 h dans une solution aqueuse d'acide trichloroacétique à 5%. Ils sont ensuite inclus dans la paraffine selon les techniques habituelles et coupés à 15 μ d'épaisseur. Sur chaque lame on place en trois groupes séparés les embryons animalisés, végétalisés et les témoins. Cette disposition a pour but d'uniformiser les conditions de coloration et de faciliter les comparaisons entre ces trois types d'embryons. Les coupes sont collées à l'eau gélatineuse. L'emploi de l'albumine est évité pour cet usage en raison de la présence des groupes sulfhydriles dans l'albumine. La méthode de BENNETT[9] est utilisée pour la détection des groupes sulfhydriles. Ces groupes donnent une coloration orange avec le réactif de Bennett, le 1-(-4-chloromercuriphenylazo)-2-naphtol. Les coupes sont mises pendant 3 h dans une solution saturée de 1-(-4-chloromercuriphenylazo)-2-naphtol (L. Light & Co.) dans l'éthanol à 80°. La spécificité de la réaction est éprouvée sur des coupes témoins dans lesquelles le blocage des groupes sulfhydriles est effectué au préalable par des réactifs spécifiques de ces groupes. Nous avons à cet effet traité les coupes pendant 24 h dans une solution saturée d'acide phénylmercuribenzoïque ou d'acide *p*-chloromercuribenzoïque dans l'éthanol à 80°. L'absence de coloration ultérieure par le réactif de Bennett indique que les groupes sulfhydriles ont été bloqués par ces agents. Ces deux agents se sont montrés également efficaces à cet égard. Il est ainsi possible de considérer que la coloration due au réactif de Bennett dans les coupes non traitées est liée à la présence des groupes sulfhydriles. L'observation de la coloration faiblement orange des coupes est facilitée par l'emploi de filtres constitués par un film photographique coloré avec une solution de bleu de toluidine[10]. Dans ces conditions la coloration apparaît en rouge sur fonds bleuté.

Résultats. Nous avons au préalable observé la répartition des groupes sulfhydriles au stade 2 blastomères. Pendant la métaphase, la coloration rouge signalant la présence des groupes sulfhydriles, est particulièrement intense au niveau des fuseaux et des asters. Ces observations sur l'œuf de *Paracentrotus lividus* confirment les observations antérieures faites par KAWAMURA et DAN[10] sur les œufs des 4 espèces d'oursins: *Clypeaster japonicus*, *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Pseudocentrotus depressus* et *Mespilia globulus*.

L'observation microscopique des embryons animalisés, végétalisés et témoins a été faite sur les sections dont le plan de coupe passe par les pôles animal et végétal. Sur les coupes d'embryons animalisés, on repère facilement le pôle animal grâce à l'épaississement apical ectodermique très accentué, et le pôle végétal où se trouve localisé un petit groupe de cellules mésenchymateuses primaires. L'orientation des embryons végétalisés est également facile puisque la plupart d'entre eux sont formés d'une partie ectodermique de petite taille, à parois minces, raccordée à une partie entomésodermique très volumineuse et à parois épaisses. Les embryons animalisés et végétalisés ainsi que les témoins sont colorés en rouge et la coloration apparaît uniformément répartie sur chaque coupe. Nous en concluons qu'il n'y a pas de gradients de répartition des groupes sulfhydriles dans les gastrulas témoins et dans les embryons animalisés et végétalisés dans ces conditions. La coloration est sensiblement de même intensité dans les gastrulas témoins et dans les embryons végétalisés. Les embryons animalisés présentent de nettes différences à cet égard, certaines coupes d'une même préparation apparaissent plus colorées que d'autres. D'une façon générale, et compte tenu de ces variations individuelles, la coloration des embryons animalisés est plus accentuée que celle des gastrulas témoins et des embryons végétalisés. Ce phénomène présente un intérêt particulier si l'on se rappelle que le zinc utilisé pour provoquer l'animalisation présente lui-même une certaine affinité pour les groupes sulfhydriles. Dans ces conditions, on pourrait s'attendre à une diminution des groupes sulfhydriles colorables par le réactif de Bennett. L'étude de ce phénomène pourra être abordée par le dosage direct des groupes sulfhydriles aux différentes étapes de l'animalisation par les ions zinc. BÄCKSTRÖM[11] a étudié par des méthodes microchimiques et histochimiques les groupes sulfhydriles dans les embryons animalisés par l'acide *o*-iodosobenzoïque et dans les embryons végétalisés par le lithium. La concentration en groupes sulfhydriles présente une série de variations au début du développement, puis elle diminue au moment de la différenciation du squelette et de l'intestin. Par rapport aux témoins, la teneur en groupes sulfhydriles reste toutefois légèrement supérieure dans les embryons animalisés et légèrement inférieure dans les embryons végétalisés. Aucune relation n'apparaît entre la distribution des groupes sulfhydriles et les gradients de réduction[7]. Les observations de BÄCKSTRÖM et les nôtres montrent que l'animalisation et la végétalisation n'entraînent pas de perturbations notables dans la répartition des groupes sulfhydriles. La participation éventuelle de ces groupes aux processus de l'animalisation et de la végétalisation reste à déterminer par l'analyse des effets d'autres agents animalisants et végétalisants. Nous rappellerons qu'en ce qui concerne les ions zinc, leur affinité pour les groupes sulfhydriles n'apparaît pas jouer un rôle essentiel dans leur action animalisante, puisque, en effet, un métal très proche du zinc, le cadmium, n'exerce qu'une faible action animalisante alors que son affinité pour les groupes sulfhydriles est supérieure à celle du zinc.

Summary. A cytochemical study of the distribution of sulfhydryl groups in animalized and vegetalized embryos of the sea-urchin *Paracentrotus lividus* has been made by use of the Bennett's reagent. The distribution of the sulfhydryl groups appears homogeneous in these embryos. No gradient has been observed in the experimental conditions used.

LUCIENNE FENAUX

Station Zoologique, Villefranche-sur-Mer (Alpes Maritimes, France), le 22 mars 1961.

[9] H. S. BENNETT, Anat. Rec. *110*, 231 (1951).
(1958).
[11] S. BÄCKSTRÖM, Exp. Cell Res. *16*, 165 (1959).
[10] N. KAWAMURA et K. DAN, J. biophysic and biochem. Cytol. *4*, 615

Histochemical Demonstration of Uridine Diphosphate Glucose Dehydrogenase

In mammalian liver, the biosynthesis of glucoronides involves the formation of uridine diphosphoglucuronic acid (UDPGA)[1]. This 'active glucuronate' is formed from uridine diphosphate glucose (UDPG) by a diphosphopyridine nucleotide (DPN)-specific dehydrogenase[2,3]. The purified dehydrogenase[4] catalyzes an irreversible two-step dehydrogenation of UDPG at the carbon-6 of glucose: UDPG + 2 DPN^+ → UDPGA + 2 DPNH + 2 H^+.

[1] G. J. DUTTON and I. D. E. STOREY, Biochem. J. *53*, xxxvii (1953).
[2] J. L. STROMINGER, H. M. KALCKAR, J. AXELROD, and E. S. MAXWELL, J. Amer. chem. Soc. *76*, 6411 (1954).
[3] J. L. STROMINGER, E. S. MAXWELL, J. AXELROD, and H. M. KALCKAR, J. biol. Chem. *224*, 79 (1957).

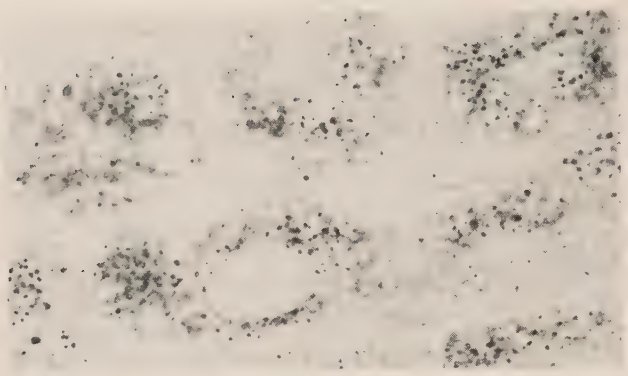


Fig. 1. Sites of UDPG dehydrogenase activity in rat liver epithelium. × 960.

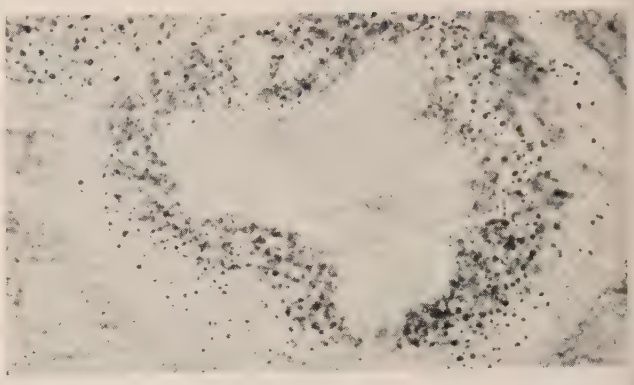


Fig. 2. UDPG dehydrogenase activity in proximal tubule of rat kidney. No reaction in distal tubule (bottom). × 960.

The histochemical demonstration of sites of DPN reduction is achieved by the transfer of hydrogen from reduced coenzyme to tetrazolium salt (hydrogen acceptor) by a flavoprotein separate from the dehydrogenase. Although in sections of tissues where UDPG dehydrogenase has been shown to occur, an abundance of DPNH-tetrazolium reductase can be demonstrated to be present, tetrazole was inefficient as sole hydrogen acceptor in a system involving the oxidation of UDPG. It was found necessary to introduce a quinone (2-methyl-1:4-naphthoquinone, menadione) as intermediate electron carrier to tetrazolium. Apparently, endogenous tetrazolium reductase does not react sufficiently with DPNH generated by soluble[3] UDPG dehydrogenase. In this case, hydrogen transfer to tetrazole is better accomplished by a quinone-reductase system which is highly active in the cytoplasmic (i.e. microsomal and soluble) fractions[5]. Coating of sections with purified bacterial diaphorase did not improve the histochemical reaction. Phenazine methosulfate could not substitute for menadione as electron carrier.

Fresh sections from blocks of rat or mouse tissue, quenched in liquid oxygen, were cut at 5 μ on a cryostat and incubated at 37° for 30 min in a medium containing: UDPG (from yeast), 5×10^{-4} *M*; DPN, 3×10^{-3} *M*, menadione, 2×10^{-5} *M*; 3,5-diphenyl-2-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl) tetrazolium (MTT), 1×10^{-3} *M*; $CoCl_2$, 2.4×10^{-3} *M*; trishydroxymethyl aminomethane-HCl buffer, 0.1 *M*, pH 7.4; bovine serum albumin 1% (*w/v*). Control sections were incubated in medium lacking substrate.

Strong UDPG dehydrogenase activity was found in liver epithelium (Figure 1) and in the proximal tubular cells of kidney (Figure 2). Weak activity could be demonstrated in heart muscle fibres, in fibrocytes, and in cells of hyaline cartilage. Both skeletal muscle and intestinal epithelium were inactive. In contrast to liver cells of adult animals, no UDPG dehydrogenase activity was found in foetal liver. Low levels of both UDPGA and uridine diphosphate-trans-glucuronylase in foetal liver homogenate has been described by DUTTON[6].

In the presence of both menadione and oxidized coenzyme, the 'nothing dehydrogenase' effect[7,8] was pronounced even at pH 7.4. This effect necessitated the use of a suboptimal pH[3] for the histochemical reaction and it was essential to compare the results to non-substrate controls. Suboptimal conditions may be responsible for our failure to demonstrate UDGP dehydrogenase in certain sites where the enzyme can be assumed to be present as, for instance, in gastric mucosa[9].

Except for liver, a histochemical survey of various organs of the rat failed to establish a positive relationship between UDPG dehydrogenase and β-glucuronidase activity. At present, therefore, the hepatic parenchyma is the only structure for which histochemical evidence of a 'UDP-cycle'[10] is available.

Zusammenfassung. Es wird eine Methode zur histochemischen Lokalisation der Aktivität von DPN-spezifischer UDPG-Dehydrogenase beschrieben. Das Wasserstoff übertragende System vom reduzierten Coenzym zu *N*-Thiazol-substituiertem Monotetrazol (Reduktionsindikator) bestand in der endogenen Menadionreduktase. Stärkste UDPG-Dehydrogenaseaktivität fand sich in Leberepithelien und proximalen Nierentubuli ausgewachsener Tiere (Ratte, Maus).

R. HESS and A. G. E. PEARSE

Department of Pathology, Postgraduate Medical School, London (England), March 16, 1961.

[4] E. S. MAXWELL, H. M. KALCKAR, and J. L. STROMINGER, Arch. Biochem. Biophys. *65*, 2 (1956).
[5] R. HESS and A. G. E. PEARSE, Nature, in press (1961).
[6] G. J. DUTTON, Biochem. J. *71*, 141 (1959).
[7] E. RACKER, Physiol. Rev. *35*, 1 (1955).
[8] H. ZIMMERMANN and A. G. E. PEARSE, J. Histochem. Cytochem. *7*, 271 (1959).
[9] G. J. DUTTON and I. H. STEVENSON, Biochim. biophys. Acta *31*, 568 (1959).
[10] H. M. KALCKAR and E. S. MAXWELL, Physiol. Rev. *38*, 77 (1958).

Erythropoese bei bilateral nephrektomierten Kaninchen[1]

Es wird heute übereinstimmend angenommen, dass die Erythrozytenproduktion durch einen Plasmafaktor, Erythropoetin genannt, stimuliert wird. Der Ort der Erythropoetinbildung ist nicht sicher bekannt. Aus klinischen Beobachtungen der letzten Jahre sowie aus tierexperimentellen Untersuchungen wurde gefolgert, dass die Niere die Bildungsstätte eines erythropoetisch hochwirksamen Prinzips sein müsse. So fand man, dass bei Patienten mit bestimmten schweren Nierenerkrankungen wie Hypernephrom, Nierencarcinom, Hydronephrose, Cystenniere, gleichzeitig eine Polyzythämie bestand, die gelegentlich nach Entfernung der erkrankten Niere wieder verschwand.

[1] Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Kaninchen Nr.	% Erythroblasten im Knochenmark Tage nach Nephrektomie 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Rest-N (mg%) am letzten Tag
1	41,1											154
2	29,1											145
3	55,3											–
4		26,2										–
5		34,8										156
6		44,9										198
7			42,3									–
8				48,5								252
9				40,8								177
10				41,1								140
11				33,9								305
12					50,5							195
13					46,1							267
14						40,0						295
15						35,0						270
16						53,0						186
17							53,1					305
18								37,4				368
19								41,4				398
20											40,3	281
21											57,7	133

Andererseits zeigten Patienten mit akutem Nierenversagen eine hochgradige Erythroblastopenie.

In überzeugenden Untersuchungen konnte NAETS[2,3] nachweisen, dass es beim Hunde nach bilateraler Nephrektomie, jedoch nicht nach bilateraler Ureterenligatur, zum Verschwinden des erythropoetisch wirksamen Faktors im Plasma und einer völligen Aplasie der erythroblastischen Reihe im Knochenmark kommt. In beiden Gruppen der urämischen Tiere waren die Rest-N-Werte im Serum gleich stark erhöht. Bereits in den ersten Tagen nach der Entfernung der zweiten Niere war die Zahl der Erythroblasten im Knochenmark auf 2–4% vermindert, und vom 5. Tage an liessen sich keine Erythroblasten mehr nachweisen.

Im Gegensatz dazu folgerte ERSLEV[4] aus seinen Versuchen an bilateral nephrektomierten Kaninchen, dass die sich entwickelnde Anämie in erster Linie auf die gestörte Stoffwechsellage mit hochgradiger Retention harnpflichtiger Substanzen, weniger auf die Gegenwart oder Abwesenheit von Nierengewebe zurückzuführen ist. Eigene, seit dem Jahre 1958 unternommene und noch nicht veröffentlichte Untersuchungen bei insgesamt 51 doppelseitig nephrektomierten Kaninchen, führten zu einer ähnlichen Auffassung.

Zur Untersuchung verwendeten wir erwachsene männliche und weibliche Kaninchen. Die Operation erfolgte in Allgemeinnarkose (Evipan-Na), wobei beide Nieren gleichzeitig entfernt wurden. Unmittelbar vor der Nephrektomie wurde ein Aderlass vorgenommen (ca. 13 ml/kg Körpergewicht). Um einen hypovolämischen Kollaps zu vermeiden, erfolgte anschliessend eine Injektion von Dextran (6%ig) in adäquaten Volumina. Vom 2. Tag an wurde täglich eine intraperitoneale Dialyse mit der von MERRILL[5] angegebenen Lösung durchgeführt. Die spontane Nahrungsaufnahme der Tiere war sehr gering und hörte am 4. Tag meist völlig auf. Zur Deckung des Flüssigkeitsminimums erhielten die Kaninchen pro Tag 60–80 ml Flüssigkeit, teils intravenös, teils *per os*. Nach dem Tode wurde der Femur sofort *in toto* entfernt und nach Eröffnung der Markhöhle Tupfpräparate aus dem Bereich der Metaphyse und beider Epiphysen angefertigt. Es wurden jeweils mindestens 800, meist 1200 kernhaltige Zellen ausgezählt und der Anteil der Erythroblasten in % angegeben. In der Tabelle wurden die entsprechenden Ergebnisse von 21 Kaninchen, die unter weitgehend einheitlichen Versuchsbedingungen standen, wiedergegeben. Die übrigen hämatologischen Befunde, die Ergebnisse des ^{59}Fe-Einbaues in Erythroblasten sowie die festgestellten Serumelektrolytveränderungen werden an anderer Stelle ausführlich mitgeteilt.

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, kam es bei keinem der nierenlosen Tiere zu einer Erythroblastopenie. Der Durchschnittswert der Erythroblasten im Knochenmark dieser 21 nephrektomierten Kaninchen betrug 42,5% (Standardabweichung = 8,4%) und lag somit im Mittel höher als der Durchschnittswert bei 10 normalen Tieren (35,8%, Standardabweichung 10,4%). Bei einem am 11. Tage nach bilateraler Nephrektomie getöteten Tier fand sich eine Erythroblastose von 57,7%.

Unsere Versuche zeigen eindeutig, dass die Erythroblastenproduktion im Kaninchenknochenmark auch in Abwesenheit von Nierengewebe erfolgt. Die Nieren können beim Kaninchen somit nicht die wesentliche, jedenfalls nicht die einzige Bildungsstelle eines erythropoetisch wirksamen Stoffes sein.

Summary. Our experiments with bilaterally nephrectomized rabbits, in contrast to experiments of other authors with dogs, demonstrated that the production of erythroblasts in the bone marrow in the absence of kidney tissues not only continues but that it can also be augmented following bleeding.

J. FISCHER und L. FRIEDERICI

Medizinische Poliklinik der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz (Deutschland), 28. April 1961.

[2] J. P. NAETS, Exper. *14*, 74 (1958).
[3] J. P. NAETS, J. clin. Invest. *39*, 102 (1960).
[4] A. J. ERSLEV, Arch. int. Med. *101*, 407 (1958).
[5] J. P. MERRILL, *The Treatment of Renal Failure* (Grune & Stratton, New York and London 1955).

Biochemical Changes Occuring during the Development of a Turpentine Granuloma

A series of models has been suggested for the study of the non-specific inflammatory reactivity of the connective tissue. Biochemically and morphologically best known is the so-called carrageenin granuloma induced by subcutaneous injection of the extract of the alga, *Chondrus crispus*, which proved best for these purposes. Its biochemical profile passes *via* accumulation of desoxyribonucleic acid and of mucopolysaccharides of the ground substance to maximal formation of insoluble scleroproteins from soluble precursors and to slow absorption of the granuloma[1,2]. We intended to ascertain if similar non-specific changes will be observed in the connective tissue components during the development of an experimental granuloma induced by subcutaneous injection of turpentine oil.

Methods. The trial was performed on 75 male Wistar rats, weighing 100 g each. The animals were kept on Larsen diet and water *ad libitum*. Experimental granuloma was induced by subcutaneous injection of 0.2 ml of turpentine oil (*Oleum terebinthinae rect.*). One injection was given into the subcutaneous tissue of the thorax, the second into the abdominal area so as to obtain sufficient amount of tissue. The animals were divided into 5 groups of 15 rats. Different groups were killed by decapitation on the third, fifth, seventh, tenth, and fourteenth day of the trial. The granulomas were extirpated and the granuloma tissue from the thoracic and abdominal area was collected and homogenized with 0.5 ml of 0.1 *N* NaOH in a glass high-speed homogenizer. The homogenate was then dried to a constant weight at 105°C. In the dry material we determined:

(1) The total hydroxyproline after hydrolyzing the whole unmodified tissue with 6 *N* HCl at 105°C during 20 h. For the determination of hydroxyproline, we employed the method according to STEGEMANN in the modification of CHVAPIL[3,4]. (2) Alkali soluble substances containing hydroxyproline (hereinafter ALOH) were obtained with the use of repeated extraction of a part of the homogenate with 0.1 *N* NaOH at room temperature during 26 h. (3) Insoluble connective tissue proteins (scleroproteins) were determined in the tissue remained after extraction of ALOH, by estimation of hydroxyproline content in its hydrolyzate. (4) The desoxyribonucleic acid content was determined, subsequent to extraction with trichloracetic acid, using the method according to SCHNEIDER[5]. (5) The hexosamine content was determined in the tissue using the method according to BLIX[6]. (6) Total nitrogen was determined using the microdifusion method of CONWAY[7].

Results. The results are summarized in the Table. The total hydroxyproline content curve culminates between the fifth and seventh day with subsequent decline toward the tenth and fourteenth day where the granuloma is absorbed (Figure 1). The ALOH levels culminate on the fifth day with subsequent rise in the content of insoluble connective tissue proteins up to the maximum on the seventh day. Then the ALOH levels fall. Later a parallel fall of the levels of ALOH and of insoluble connective tissue proteins occur. On the fourteenth day, the levels of ALOH are higher than the levels of insoluble connective tissue proteins. The desoxyribonucleic acid content reaches its highest peak on the fifth day when also hexosamine content shows its maximum (Figure 2). There is then a continual fall of both substances. It is possible to distinguish three stages of the inflammatory reaction which can be observed also in the development of a turpentine granuloma. The development of this reaction lasts, in some cases, several months (experimental silicosis), in other instances from days to weeks (carrageenin

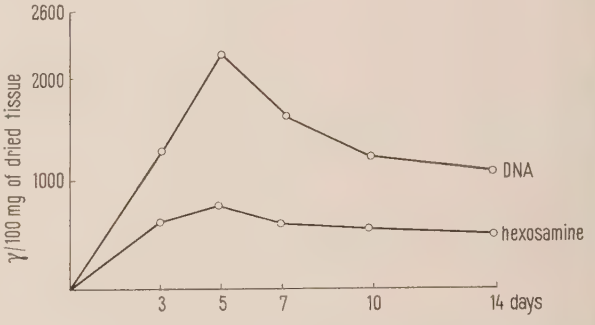


Fig. 1. Biochemical changes occuring during the development of a turpentine granuloma.

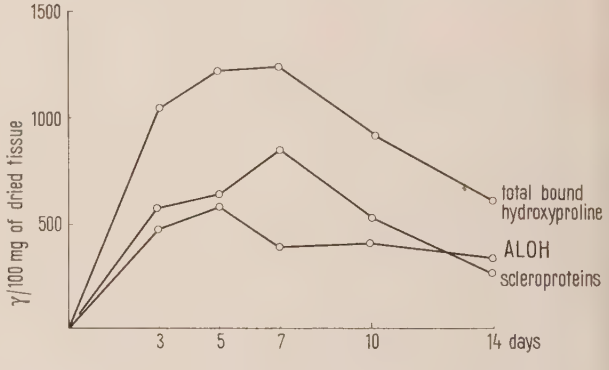


Fig. 2. Biochemical changes occuring during the development of a turpentine granuloma.

1 D. S. JACKSON, Biochem. J. *62*, 25 (1956).
2 M. CHVAPIL, Nature *186*, 806 (1960).
3 H. STEGEMANN, Z. physiol. Chem. *311*, 41 (1958).
4 M. CHVAPIL, Čsl. fysiologie *8*, 81 (1959).
5 W. SCHNEIDER, J. biol. Chem. *161*, 293 (1945).
6 G. BLIX, Acta chem. scand. *2*, 467 (1948).
7 E. J. CONWAY, *Microdiffusion and Volumometric Errors* (London 1947).

Days	Total hydroxyproline /100 mg of dried tissue	ALOH /100 mg of dried tissue	Insoluble scleroprotein /100 mg of dried tissue	DNA /100 mg of dried tissue	Hexosamine /100 mg of dried tissue	Nitrogen /100 mg of dried tissue
3	1054 ± 97,5	475	579,5 ± 28,6	1262 ± 125,0	646 ± 41,3	4,93 ± 0,33
5	1225 ± 53,0	586	638 ± 39,1	2239 ± 122,8	805 ± 12,5	7,96 ± 0,44
7	1233 ± 47,2	388	845 ± 56,6	1663 ± 72,1	612 ± 78,2	4,88 ± 0,25
10	925 ± 52,0	409	516 ± 38,7	1280 ± 49,0	593 ± 34,6	4,50 ± 0,40
14	600 ± 45,0	330	269 ± 46,6	1143 ± 37,6	562 ± 40,0	5,50 ± 0,65

or turpentine granuloma). In the first stage, activation of cellular elements and mucopolysaccharides of the ground substance occurs—the apex of the desoxyribonucleic acid and hexosamine content in turpentine granuloma attained on the fifth day of the trial. The cellular component and the mucopolysaccharides form the basis for the development of connective tissue proteins. The second stage sets in—as shown by biochemical results—on the seventh day of the development of a turpentine granuloma when the levels of insoluble connective tissue proteins culminate. Finally in the third and last stage, the involved tissue is restored. The results show the turpentine granuloma to be a suitable model for the study of biological functions of the connective tissue in organism.

Zusammenfassung. Die Bildung eines Versuchsgranuloms, bei Ratten mittels subkutaner Injektion von Terpentinöl hervorgerufen, wurde verfolgt. Im Verlauf der Bildung des Granuloms erreichten die Spiegel der Desoxyribonukleinsäure und der Hexosamine am fünften und die Spiegel der unlöslichen Bindegewebeproteine am siebenten Tag des Versuches ihren Höhepunkt. Das Terpentinölgranulom zeigt sich als ein geeignetes Modell für das Studium der Bindegewebereaktivität.

K. Trnavský, Z. Trnavská, and V. Lapárová

Research Institute of Rheumatic Diseases, Piešťany (Czechoslovakia), October 20, 1960.

Effect of X-Irradiation on Triglyceride Metabolism of the Rabbit

The exposure of various animals species to lethal X-irradiation results in significant alterations in plasma lipid and lipoprotein metabolism[1–3]. This is characterized in the rabbit by a pronounced hyperlipemia[4–5].

This study was undertaken to determine if radiation lipemia was due to an impairment in the removal rate of plasma triglycerides. In view of the intimate relationship between various plasma lipids, whereby an elevation in one results in concomitant increases in other lipids[6], the initial accumulation of plasma triglyceride could explain the rise in various other lipid fractions which characterizes radiation lipemia[2,7].

The intravascular removal rate of an injected I^{131} labeled triolein emulsion was measured in normal and X-irradiated rabbits. The concentrations of plasma triglycerides and free fatty acids (FFA) and the extent of hepatic deposition of I^{131} triolein were also determined.

Methods. Blood samples were obtained from the central ear artery of New Zealand Albino rabbits of either sex and weighing approximately 2.5 kg, prior to, and 16 h following sham-irradiation or exposure to 1000 r whole body X-irradiation. The X-ray unit was operated at 250 KVP, 15 ma with HVL of 2.0 mm Cu. The dose rate was 32 r/min at a mid-point distance of 70 cm, control and experimental rabbits were then fasted for 16 h. Plasma triglyceride[8] and free fatty acids[9] were determined. The I^{131} labeled triolein emulsion was prepared as an anhydrous base[10] employing corn oil. The emulsion was administered intravenously 16 h after radiation exposure, as a 15% solution in the amount of 0.5 g of triglyceride/kg. The disappearance of the phospholipid and triglyceride components of this emulsion has been shown to be similar to that of homologous chylomicrons[10] and has been employed as a quantitative index of the intravascular removal rate of emulsified triglyceride[11].

Serial intracardiac blood samples were obtained from 2 to 30 min following the injection of the emulsion in unanesthetized rabbits and total radioactivity determined. The I^{131} labeled lipid in whole blood was precipitated in the presence of carrier iodide by trichloroacetic acid[12] and counted in a scintillation counter. The data was analyzed according to the t-test for paired observations or employing a pooled variance.

Discussion and Results. In both control and irradiated groups the plasma FFA concentrations after 16 h of fasting were significantly higher than the initial values. Since no significant differences were noted between groups, the increased levels reflect the fasting state.

Plasma triglyceride concentrations in all control rabbits were significantly decreased below their initial values. In contrast, the plasma triglyceride concentrations in all the X-irradiated rabbits were significantly increased by a mean of 337% with increases ranging from 18 to 2140% above the pre-irradiation value.

A study of the plasma lipid alterations prior to and during the development of radiation lipemia indicated that plasma triglyceride, phospholipid and cholesterol

[1] R. L. Rosenthal, Science *110*, 43 (1949).
[2] J. E. Hewitt and T. L. Hayes, Amer. J. Physiol. *185*, 257 (1956).
[3] W. A. Goldwater and C. Entenman, Radiation Res. *4*, 243 (1956).
[4] T. L. Hayes and J. E. Hewitt, Amer. J. Physiol. *181*, 280 (1955).
[5] N. R. Di Luzio and K. A. Simon, Radiation Res. *7*, 79 (1957).
[6] S. O. Byers and M. Friedman, Amer. J. Physiol. *193*, 435 (1958).
[7] E. E. Elko and N. R. Di Luzio, Radiation Res. *11*, 1 (1959).
[8] E. Van Handel and D. B. Zilversmit, J. lab. clin. Med. *50*, 152 (1957).
[9] V. P. Dole, J. clin. Invest. *35*, 105 (1956).
[10] E. L. McCandless and D. B. Zilversmit, Amer. J. Physiol. *193*, 294 (1958).
[11] E. Van Handel and D. B. Zilversmit, J. lab. clin. Med. *52*, 831 (1958).
[12] D. A. Turner, Amer. J. digest. Diseases *3*, 594 (1958).

Effect of X-irradiation on lipid metabolism of rabbits

Group and No.	Plasma FFA mEq/L 0 h	Plasma FFA mEq/L 16 h	Plasma Triglyceride mg% 0 h	Plasma Triglyceride mg% 16 h	I^{131} Triolein t/2 min
Control (6)	0.430 ± 0.041	0.692 ± 0.078	70.7 ± 13.3	40.5 ± 6.1	3.8 ± 0.7
1000 r (6)	0.434 ± 0.063	0.754 ± 0.112	66.8 ± 17.8	291.9 ± 73.8	4.0 ± 0.6

Values are expressed as means ± standard error. The half-time (t/2) is equal to the time at which the amount of radioactivity present in blood is reduced to one-half its zero-time concentration. This is determined by plotting, semilogarithmically, the blood radioactivity against time.

fractions were all increased simultaneously, while no significant alteration occurred in the plasma FFA, making it unlikely that an initial disturbance in one lipid class was a causative factor in radiation lipemia[13].

Although a significant elevation in plasma triglyceride concentration occurred following radiation exposure, the intravascular removal rate of I^{131} triolein in the X-irradiated rabbits was comparable to that obtained in the control group with the mean half-time being approximately 4 min. Although the disappearance rates of I^{131} triolein and the chemically determined triglycerides of the emulsion were found to be identical, no correlation existed between the initial plasma triglyceride level and the removal rate of injected triglyceride.

The liver uptake of I^{131} triolein was measured in an additional group of six control rabbits and six X-irradiated rabbits. 30 min after administration of the emulsion, the total I^{131} activity of liver was 61.1 and 56.4% in the control and X-irradiated rabbits respectively. No difference in degree of deiodination (8%) was observed between the control and experimental group. Although it has been suggested that the deiodination of lipid might be correlated with the metabolic turnover of triglycerides, a limitation is suggested since I^{131} lipids although possessing a similar tissue distribution as C^{14} labeled fatty acids, do not have a similar incorporation into liver phospholipids[11].

The present data demonstrate a normal ability of X-irradiated rabbits to remove excess triglyceride from the circulation, and a normal rate of entry of the injected lipid into hepatic tissue. If the metabolic behavior of chylomicra and the I^{131} triolein emulsion in the rabbit are comparable as reported in the dog[10], these findings indicate that the post-irradiation hyperlipemic state was not due to impairment in the removal rate of plasma triglyceride. The ability of X-irradiated rabbits to efficiently remove a lipid load sufficient to elevate plasma triglyceride levels 10–20 fold and yet manifest a post-irradiation hyperlipemia suggests the presence of abnormal lipoproteins of chylomicra which X-irradiated rabbits cannot efficiently metabolize[14].

Zusammenfassung. Nach letaler Röntgenbestrahlung wurde eine Zunahme der Triglyceride, aber keine Veränderung der freien Fettsäuren im Kaninchenplasma gefunden. Eine Belastungsprobe mit I^{131} markierten Trioleins hat zu keiner Verhinderung der hepatischen Akkumulierung dieses Stoffes in den bestrahlten Tieren geführt. Der Befund weist darauf hin, dass nach Röntgenbestrahlung keine Störung des Fetttransportes aus dem Plasma resultiert, sondern dass die Lipämie eventuell durch abnorme Chylomicra zustande kommt.

N. R. DI LUZIO, E. E. ELKO,
N. R. SEIDENVERG, and C. ENTENMAN

Division of Physiology, University of Tennessee Medical Units, Memphis, and the U.S. Naval Radiological Defense Laboratory, San Francisco (California), April 18, 1961.

[13] E. E. ELKO and N. R. DI LUZIO, Radiation Res. *12*, 432 (1960).

[14] This study was supported in part by a grant from the Public Health Service (A-2906).

Beitrag zur Wirkung des Hygroton®

Bei der Ödemgenese spielen die natriumretinierenden Corticosteroide, insbesondere das Aldosteron, eine entscheidende Rolle. Damit ergibt sich bei der Ödemtherapie mit Diuretica zwangsläufig eine wechselseitige Beeinflussung zwischen den natriumretinierenden Hormonen und den natriuretisch wirkenden, gleichfalls tubulär angreifenden Diuretica, wobei die Ausgangslage entscheidend ist für die Resultante beider Effekte. So kann an der intakten Ratte die durch Hygroton hervorgerufene Salurese durch Desoxycorticosteron-Glucosid abgeschwächt und die Kaliurese gesteigert werden (STENGER[1]). VEYRAT et al.[2,3] zeigten am Beispiel von Hygroton, dass das Versagen des Diureticums bei Patienten mit nachweisbarem Hyperaldosteronismus zumindest teilweise auf den erhöhten Aldosteronspiegel zurückgeführt werden kann.

Mit der Entwicklung der Spirolactone (CELLA et al.[4]; KAGAWA[5]; KAGAWA et al.[6]; LIDDLE[7]) wurde ein Verbindungstypus geschaffen, dessen Wirkungsmechanismus nach unseren heutigen Kenntnissen auf einer reversiblen kompetitiven Hemmung der Mineralocorticoide in den distalen Abschnitten des Nephrons beruht, woraus eine Natriurese bei gleichzeitiger Einschränkung der Kaliumelimination resultiert. Die Wirkung der Spirolactone ist an das Vorhandensein eines erhöhten Mineralocorticoid-Spiegels im Nierentubulus gebunden. Diese Mineralocorticoid-Antagonisten eignen sich somit zur Therapie jenes Ödemtypus, der allein oder vorwiegend durch einen erhöhten Aldosteronspiegel unterhalten wird.

In der vorliegenden Arbeit berichten wir über die Elektrolytelimination im Urin nach gleichzeitiger Applikation von Hygroton und Spironolacton an der Ratte.

Methodik. Die Untersuchungen erfolgten an männlichen weissen Ratten im Gewicht von 130–180 g (Trockenmischfutter; Wasser *ad libitum*). Verabreichung der Substanzen: allein oder gleichzeitig, 40 min vor Wasserstoss (50 ml/kg *per os*). Unmittelbar danach wurden die Tiere einzeln in Stoffwechselkäfige eingesetzt und die eliminierten Mengen

Elektrolytelimination im Urin während 5 h

Substanz	Dosis mg/kg	Harn ml/h	Na^+	K^+ m Aeq/h	Cl^-	Tierzahl
Kontrolle	—	1,32	0,032	0,063	0,051	303
Hygroton®	2,5 *per os*	1,72	0,050	0,076	0,065	60
	5 *per os*	1,83	0,067	0,085	0,100	175
	7,5 *per os*	1,68	0,106	0,118	0,140	20
	5 subkutan	1,86	0,096	0,095	0,127	60
	10 subkutan	1,78	0,091	0,078	0,106	20
Spironolacton	2,5 *per os*	1,34	0,022	0,051	0,039	20
	5 *per os*	1,43	0,032	0,067	0,053	20
	10 *per os*	1,56	0,025	0,057	0,039	20

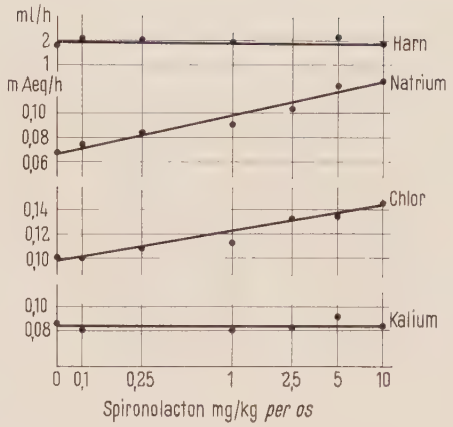
[1] E. G. STENGER, Arch. exp. Path. Pharmakol. *238*, 225 (1960).
[2] R. VEYRAT, E. ARNOLD und A. F. MULLER, Bull. schweiz. Akad. med. Wiss. *15*, 360 (1959).
[3] R. VEYRAT, A. F. MULLER, A. DUCKERT und A. M. RIONDEL, Helv. med. Acta *26*, 666 (1959).
[4] J. A. CELLA und C. M. KAGAWA, J. Amer. Chem. Soc. *79*, 4808 (1957).
[5] C. M. KAGAWA, Endocrinol. *67*, 125 (1960).
[6] C. M. KAGAWA, J. A. CELLA und C. G. VAN ARMAN, Science *126*, 1015 (1957).

an Natrium und Kalium (flammenphotometrische Bestimmung) sowie Chlor (potentiometrische Titration) während 5 h erfasst.

Resultate. Im Gegensatz zu Hygroton führt Spironolacton im gleichen Dosierungsbereich an der Ratte zu keiner signifikanten Änderung der Elektrolytausscheidung im Urin (Tabelle), was auf Grund des Wirkungsmechanismus der Spirolactone bei normaler Mineralocorticoid-Bilanz auch nicht zu erwarten ist[4–7].

Durch gleichzeitige perorale Applikation von Hygroton 5 mg/kg und Spironolacton 0,1–10 mg/kg lässt sich eine Intensivierung des natriuretischen und chloruretischen Effektes von Hygroton in Abhängigkeit von der Spironolactondosis erzielen (Figur), wobei Natriurese und Chlorurese parallel verlaufen und die Elimination an Chlor die an Natrium übertrifft; die Kaliumausscheidung hingegen erfährt *keine* Steigerung.

Wenn es im vorliegenden Kombinationsversuch trotz normalem Mineralocorticoidspiegel der Versuchstiere zu einer natriuretischen Wirkung des Spironolacton kommt, so scheint uns folgende Interpretation am wahrscheinlichsten: am Normaltier ist die Natrium-Rückresorption in den proximalen Abschnitten des Nephrons bereits so stark, dass distal, also am Wirkungsort der Spirolactone, nicht mehr genügend Natrium zur Entfaltung eines messbaren Spirolacton-Effektes zur Verfügung steht. Wird dagegen durch gleichzeitige Verabreichung von Hygroton die proximale Natrium-Rückresorption teilweise blockiert, so gelangt genügend Natrium als Substrat für die Spironolacton-Wirkung in die distalen Abschnitte des Nephrons. Ähnliche Überlegungen stellten Hild et al.[8], Veyrat et al.[9] für eine Kombinationstherapie Salureticum-Spirolacton bei therapieresistenten Ödemen an.



Elektrolytelimination im Urin nach Kombination von Hygroton® 5 mg/kg *per os* + Spironolacton, wasserbelastete Ratte (50 ml/kg *per os* Wasser).

Summary. When Hygroton® and spironolactone are given together to rats, the urinary excretion of sodium and chlorides induced by Hygroton increases with increasing doses of spironolactone, but that of potassium does not.

E. G. Stenger

Wissenschaftliche Laboratorien der J. R. Geigy A.G., Basel, 11. April 1961.

7 G. W. Liddle, Science *126*, 1016 (1957).
8 R. Hild und F. Krück, Klin. Wschr. *39*, 178 (1961).
9 R. Veyrat, E. Engel, P. Ducommun und A. F. Muller, Helv. med. Acta *27*, 683 (1960).

EEG Synchronization Produced by Peripheral Nerve Stimulation[1]

The present experiments are concerned with the influence of peripheral nerve stimulation on the EEG synchronizing mechanisms.

Using barbiturate anesthesia, the following electrodes were chronically implanted in each of 20 cats: 1–3 nerve stimulating electrodes, 1–2 EMG electrodes placed in the neck extensor muscles, and 6–10 screwtype cortical electrodes. The superficial radial, sciatic, femoral, gastrocnemius, hamstring, and saphenous nerves were tested. No recordings were taken until 48 h after the operation. The testing procedure involved placing the unrestrained animals in a large box which permitted continuous observation of their reactions to the stimuli.

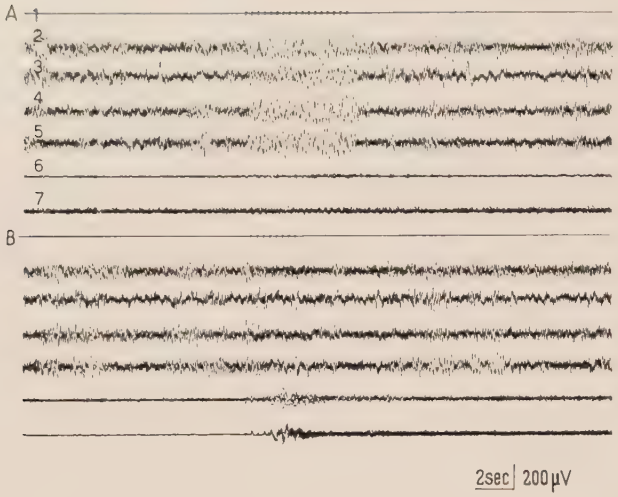
Providing that cortical activity had a natural tendency to be synchronized, carefully controlled peripheral nerve stimuli at 3–8/sec (0.1–0.5 msec pulse duration) could repeatedly induce a clear-cut generalyzed EEG synchronization. Stimulus trains, 2–4 sec in duration, were given approximately every 20 sec. The induced pattern of EEG synchronization exhibited waxing and waning characteristics and was sometimes accompanied by closure of the eyes at the onset of the stimulus. Also the tonic EMG activity of the skeletal musculature decreased providing that the EMG activity was already at a low level. The optimum stimulus values for obtaining EEG synchronization were unable to produce this effect during an EEG background of low voltage fast activity seen in either full alertness or deep sleep[2].

The problem of eliciting EEG synchronization is complicated by some habituation to the stimulus at the beginning of every recording period. The first stimulus of low intensity causes strong EEG arousal and an increase of EMG activity, but after a few repetitions this reaction completely disappears. If the stimulus intensity is increased in stages, this phenomenon repeats itself until a stimulus value is reached which always gives a weak arousal reaction. This is defined as the threshold for arousal and it is always determined for the particular type of EEG background best for inducing EEG synchronization. It is only at this point, when the animal's reactions to the stimuli have become stabilized, that EEG synchronization can be obtained at mean stimulus intensities 0.4–0.9 times the threshold for arousal. The Figure illustrates the effect of low frequency stimulation of a cutaneous nerve at slightly different stimulus strengths.

The superficial radial nerve was best for producing EEG synchronization since there were no arousing effects due to muscular movements as had been found when stimulating mixed or pure muscular nerves. However, it was also possible to obtain synchronization with these latter nerve types at stimulus values capable of producing muscular contraction.

Altering the frequency of impulses in the stimulus train which produced EEG synchronization caused two opposing effects on the same EEG background. At frequencies below 3/sec each shock could regularly trip brief spindle

1 This investigation was supported by PHS research grant B-2990 from the National Institute of Neurological Diseases and Blindness, N.I.H., Public Health Services, U.S.A.
2 M. Jouvet, J. Dechaume et F. Michel, Lyon méd. *38*, 1 (1960).



Stimulation of the left superficial radial nerve at 3/sec, 0.5 msec and 395 μA produced synchronization (A). The eyes promptly closed at the onset of the stimulus and remained so. The stimulus intensity used was just below arousal threshold, as shown by the slight increase of EMG activity near the end of the stimulus train. Slight increase of the stimulus intensity to 430 μA caused arousal (B). The animal's eyes reopened and EMG activity increased markedly. 1: stimulus artefact; 2: right parietal-temporal; 3: right temporo-occipital; 4: left parietal-temporal; 5: left temporo-occipital; 6: EMG left neck extensor; 7: EMG right neck extensor.

bursts. Between 3–8/sec the EEG synchronization was usually uninterrupted and often tended to follow the frequency of the stimulus providing the stimulus intensity was sufficiently high. Increasing the frequency above 8/sec brought about a gradual reduction of the amplitude of the synchronized EEG pattern until all evidence of an induced synchronization disappeared altogether. The appearance of the true arousal occurred at frequencies higher than 12–16/sec. In such cases the effect was stronger when stimulus intensity was high enough to excite a small number of fibers of higher threshold capable of producing arousal in addition to those driving synchronizing mechanisms.

The conclusion is drawn that, under appropriate conditions, peripheral nerve stimulation may activate mechanisms responsible for EEG synchronization.

Riassunto. La stimolazione a 3–8/sec di nervi cutanei e muscolari, eseguita in gatti integri non anestetizzati, produce una sincronizzazione dell'attività elettrica cerebrale. La soglia per questa risposta corrisponde in media a 0,4–0,9 volte l'intensità minima di corrente che applicata allo stesso nervo e in analoghe condizioni sperimentali produce la reazione di risveglio.

O. Pompeiano and J. E. Swett

Institute of Physiology, University of Pisa (Italy), March 23, 1961.

The Effect of Litter Rank on the Secondary Sex Ratio

The secondary sex ratio (the number of males per 100 females at birth) has been reported to decrease in succeeding litters of rats[1] and with increasing birth order in humans[2]. In mice Parkes[3] found a decrease in later litters while Howard et al.[4] failed to observe any change. Recently, during the course of investigations employing mice from a variety of inbred strains data were obtained pertaining to the secondary sex ratio in succeeding litters. Even though the sample size was small, it was felt that

[1] H. D. King and J. M. Stotsenburg, Anat. Rec. *9*, 403 (1915).
[2] E. Novitski and L. Sander, Ann. Human Genet. *21*, 123 (1956–57).
[3] A. S. Parkes, Biol. Rev. *2*, 1 (1926–27).
[4] A. Howard, A. McLaren, D. Michie, and G. Sander, J. Genet. *53*, 200 (1955).

The secondary sex ratio of mice of successive litters

Strain	Litter rank	Litters	Total mice	Males	Males per litter	Females	Females per litter	Ratio
C3H/Sp	1	17	82	55	3.2 (0.4)[a]	27	1.6 (0.3)[a]	204
	2	17	101	55	3.2 (0.4)	46	2.7 (0.3)	120
	3	12	75	37	3.1 (0.3)	38	3.2 (0.5)	97
C3Hf/Sp	1	13	64	40	3.1 (0.5)	24	1.8 (0.3)	167
	2	17	91	56	3.3 (0.3)	35	2.1 (0.2)	160
	3	10	52	22	2.2 (0.4)	30	3.0 (0.5)	73
PL/Sp	1	18	77	57	3.2 (0.5)	20	1.1 (0.3)	285
	2	18	83	48	2.7 (0.4)	35	1.9 (0.4)	137
	3	9	42	25	2.8 (0.7)	17	1.9 (0.3)	147
AKR/Sp	1	16	90	62	3.9 (0.5)	28	1.7 (0.4)	221
	2	14	76	42	3.0 (0.4)	34	2.4 (0.4)	124
	3	6	34	22	3.7 (0.6)	12	2.0 (0.5)	183
MA/Sp	1	10	59	39	3.9 (0.8)	20	2.0 (0.4)	195
	2	9	57	31	3.4 (0.5)	26	2.9 (0.3)	119
	3	8	53	38	4.7 (1.1)	15	1.9 (0.4)	253
C57BL/Sp	1	10	42	23	2.3 (0.4)	19	1.9 (0.3)	121
	2	9	44	21	2.3 (0.6)	23	2.6 (0.3)	91
	3	7	36	18	2.6 (0.7)	18	2.6 (0.7)	100
Pooled F_1 hybrids C57BL × PL/Sp	1	13	82	46	3.5 (0.4)	36	2.8 (0.4)	128

[a] Figures are averages and standard errors.

some of the differences were of enough significance to warrant presentation at this time.

Female mice of the strains listed in the Table, obtained from the inbred stocks of the Detroit Institute of Cancer Research, were mated with their brothers and the progeny of the first, second, and third litters were sexed within 16 h after birth. Sexes were rechecked at least twice thereafter. Mating pens consisted of 1–4 females and 1 male. All mice were kept in wooden boxes, which were changed weekly, on racks in an air-conditioned room. Water and a commercial diet (Purina Laboratory Chow) were given *ad libitum*. When a female became detectably pregnant, she was isolated. She was returned to her original mate after her litter was weaned at 5 weeks or earlier if the litter died prior to weaning. As far as could be judged from carcasses, the number of stillbirths was estimated at less than 1%; and since it was difficult to sex the remains, they have been excluded from the data.

The results are presented in the Table. All data were analyzed statistically. Those involving the number of mice per litter were tested by Student's t-test; all others were analyzed by the Chi square method with Yates's correction for sample size.

The secondary sex ratio was elevated in all first litters but was significantly different from the theoretical value of 100 only in those born to C3H/Sp ($P < 0.05$), PL/Sp ($P < 0.01$), and AKR/Sp ($P < 0.02$) mothers. The ratio in second and third litters was invariably lower and not significantly different from the theoretical except in the case of third litters of MA/Sp mice ($P < 0.05$). The ratio was significantly decreased in second and third litters of C3H/Sp, $C3H_f$/Sp and PL/Sp mice ($P < 0.05$) from that found in first litters.

The decrease in the secondary sex ratio in succeeding litters could have been due to a decrease in the number of male births and/or an increase in female births. To elucidate this point the number of male and female births per litter were compared in those strains (C3H/Sp, $C3H_f$/Sp, and PL/Sp) that showed a significant decrease in the ratio. Significant increases in female births were found in second and third litters (P was 0.01) of C3H/Sp mice. The increase in female births in third litters of $C3H_f$/Sp and PL/Sp mice was at the borderline of significance (P was 0.05). No significant change in the number of male births was observed. These findings suggest that the increases in female live births played a role in the decrease of the secondary sex ratio in later litters of these strains. The data are contrary to the generally held idea that the decrease in the sex ratio at birth is due to a diminution in male births[5,6].

The deviation of the observed ratio from the theoretical value of 100 in first litters of C3H/Sp, PL/Sp, and AKR/Sp mice could be due to genetic and/or nongenetic factors. Mating of PL/Sp females with C57BL/Sp males (from a strain in which no deviation of the observed from the theoretical ratio was found) yielded first litter F_1 hybrids in which the ratio was 138. The latter did not significantly deviate from the theoretical. The reciprocal crosses yielded first litter progeny in which the ratio was 122. The latter did not significantly deviate either from the theoretical or from the actual ratio found in the first cross. The data for the first litter reciprocal F_1 hybrids were, therefore, pooled. The ratio of these pooled hybrids differed significantly from that of PL/Sp first litter mice ($P < 0.05$) but not from that of C57BL/Sp first litter progeny. These figures suggest that the apparent increase in the secondary sex ratio of first litter PL/Sp mice may be partially attributed to genetic factors. The decrease of the ratio in succeeding litters then implies a compensating nongenetic mechanism.

Zusammenfassung. Es wird gezeigt, dass sich verschiedene Mäusestämme im sekundären Geschlechterverhältnis unterscheiden. Die Wurffolge beeinflusst zwar die relative Zahl der Geschlechter bei der Geburt, aber dieser Einfluss wechselt mit dem Stamm selber. Der Ausgleich des Unterschieds in späteren Würfen erfolgt durch Weibchenüberschuss. Sowohl erbliche wie nichterbliche Faktoren spielen eine Rolle in der Beeinflussung des Geschlechterverhältnisses.

S. Albert, Kittie Tomson, and R. R. Small

Detroit Institute of Cancer Research and Wayne State University College of Medicine, Detroit (Michigan), February 14, 1961.

[5] J. A. Weir, J. Heredity *46*, 277 (1955).
[6] A. S. Parkes, Proc. Roy. Soc. London *95*, 551 (1923–24).
[7] *Acknowledgment.* This investigation was supported in part by research grant No. C-2151 from the National Cancer Institute, Public Health Service and in part by an institutional grant to the Detroit Institute of Cancer Research from the United Foundation of Greater Detroit through the Michigan Cancer Foundation.

The Content of Acid Fraction in Cannabis Resin of Various Age and Provenance

Considerable interest has recently been focused on the alkali soluble part of cannabis resin. Although this fraction does not exhibit any marked hashish activity[1,2], it has been observed that such constituents readily become converted by heat or by long standing into biologically active cannabinolic compounds which are insoluble in aqueous alkali[1,3]. After the isolation of cannabidiolic acid from the alkali fraction of the resin[4,5], this constituent was believed to be precursor of other cannabinolic substances[6]. By decarboxylation it yields cannabidiol[6] which can be converted by intramolecular condensation into physiologically active tetrahydrocannabinols[7], the latter yielding by spontaneous dehydrogenation almost inactive cannabinol[8,9].

Although the process of formation of various constituents of cannabis resin seems to be a very complex one, cannabidiolic acid may be considered as the main initial constituent in the gradual conversion of cannabinolic compounds. Consequently, the stage of the conversion process in a given sample of cannabis may be expected to be roughly indicated by the approximate content of cannabidiolic acid in hemp resin. Such data might be of interest in approaching the problem of determining physiological potency, geographical origin and the age of the drug.

In order to obtain a picture of the approximate content of cannabidiolic acid in various types of hemp resin, the acid fraction of the resin extracted from 31 available

[1] A. Madinaveitia, P. B. Russel, and A. R. Todd, J. chem. Soc. *1942*, 628.
[2] B. C. Bose and B. Mukerji, Nature *152*, 109 (1943).
[3] C. C. Fulton, Industr. eng. Chem. Analyt. Ed. *14*, 407 (1942).
[4] Z. Krejčí and F. Santavy, Acta Univ. Olomuc. *6*, 59 (1955).
[5] O. E. Schultz and G. Haffner, Arch. Pharm. *291/63*, 391 (1958).
[6] O. E. Schultz and G. Haffner, Arch. Pharm. *293/65*, 1 (1960).
[7] R. Adams, D. C. Pease, C. K. Cain, and J. H. Clark, J. Amer. chem. Soc. *62*, 1868 (1944).
[8] J. Levine, J. Amer. chem. Soc. *66*, 1868 (1944).
[9] S. Loewe, Science *102*, 615 (1945).

samples of *Cannabis sativa* from 10 different countries has been determined. The procedure adopted was based on the experience of some previous authors[3,6]. The extract in petrol ether was shaken out with a solution containing 5% NaOH and 5% Na_2SO_3. The alkali extract obtained was acidified by means of diluted H_2SO_4, extracted with ether, dried in vacuum, weight and calculated as percentage in dry petrol ether extract. In order to avoid decarboxylation of cannabidiolic acid, the procedure has to be run rapidly. Duplicate analyses have indicated a good reproducibility of the results. Although the acid fraction obtained by this way might contain also some other weak acids, the results are treated as if they correspond only to the content of cannabidiolic acid, which is obviously the main constituent of this fraction. The results obtained are summarized in the Table.

The content of acid fraction in various groups of samples

Origin Area	Country	Age (Production year)	Number of samples analyzed	Percentage of acid fraction in resin
Tropical	Burma	old	1	3.8
Tropical	Costa Rica	old	1	7.0
Tropical	Brazil	1959	14	5.2–10.7 (mean 8.2)
Mediterranean	Greece	—	5	8.9–15.4 (mean 12.0)
Mediterranean	Yugoslavia	—	1	16.1
Mediterranean	Morocco	1960	1	18.5
Mediterranean	Cyprus	old	1	14.1
Mediterranean	Cyprus	1959	1	33.7
Northern	Switzerland	1960	1	32.4
Northern	England	1959	1	41.7
Northern	Germany	old	5	28.4–39.1 (mean 31.8)

As is seen, the content of acid fraction in resin ranged from 3.8% to 41.7%. It was lowest in cannabis originating in tropical regions, while highest in samples from European countries, marked in the Table as 'northern area'. Samples from Mediterranean area exhibited the properties of both the groups, mostly showing the tendency to an intermediate content of acid fraction. In spite of the lack of exact data dealing with the age of certain samples, some results show that there is a lower content of acid fraction in old resin than in fresh.

The results obtained indicate that the phytochemical process of gradual conversion of cannabinolic compounds ('ripening' of the resin) is rather advanced in varieties growing in hot regions. In contrast to this, in plants developed under unfavourable climatic conditions, the 'unripe' type of the resin predominates, containing a large amount of unchanged cannabidiolic acid. It seems probable that even fresh cannabis from tropical regions mostly belong to the 'ripe' type, as the largest part of acid is converted before harvesting to more thermostable products. However, such cannabis might still be exposed to a further slight decrease in acid content during storage. In 'unripe' type of the drug, originating from northern areas, the process of additional 'ripening' during storage seems also to occur under favourable conditions. According to the results obtained, it seems that the intermediate type, represented in our work by the samples from the Mediterranean area, exhibits the greatest variations in acid content, and is probably more affected by the time and conditions of storage than the two previous types. Some of the conclusions drawn here may confirm previous findings, based on direct ultraviolet spectrophotometry of cannabis resin[10,11].

Résumé. L'acide cannabidiolique pouvant être considérée comme la substance initiale dans la conversion graduelle des composants de la résine du chanvre (*Cannabis sativa*), le taux de la fraction acide peut servir d'indication sur l'avance du processus de «mûrissement» de la résine. La teneur en acide a été trouvé la moins élevée dans la résine du chanvre provenant de régions tropicales, ce qui s'explique par la conversion plus avancée dans des variétés dévelopées sous un climat favorable et chaud. D'après les résultats obtenus, cette conversion semble continuer pendant la conservation de la drogue.

LJ. GRLIĆ and A. ANDREC

Institute for the Control of Drugs, Zagreb (Yugoslavia), March 31, 1961.

[10] United Nations Secretariat, document ST/SOA/SER. S/2 (1960).

[11] We are indebted to the Division of Narcotic Drugs of United Nations for having kindly supplied most of cannabis samples examined in this study.

Cerebral Vascular Action of Bradykinin in the Dog

One of the most important biological effects of bradykinin is its action on the vascular system[1]; moreover the demonstration of the presence of kinin-forming enzymes in perfusates of different systems[2] supports the view that bradykinin may play a role in the regulation of local blood flow in various vascular districts[3]. The presence of these enzymes also in the perfusates of the ventricular system of the cat[4] suggests the need for a critical evaluation of the effects of bradykinin on cerebral vascular flow. Moreover, since the description of its chemical composition and its synthesis[5], investigations of its effects can be carried out with much greater reliability.

In the present study, the vascular reactions of the brain vessels were studied in the chloralosed dog by means of a previously developed technique consisting of the registration of the intracranial venous pressure by means of a catheter introduced in a craniad direction into the peripheral portion of the external jugular vein[6]; simultaneous tracings of arterial pressure, intracranial venous pressure, other vascular phenomena (systemic venous pressure, nasal plethysmogram[6] venous outflow from the superior sagittal sinus[7]) and respiration were registered on a 6-channel Grass Polygraph. The effects of intravenous administration

[1] M. ROCHA Y SILVA, W. T. BERALDO, and G. ROSENFELD, Amer. J. Physiol. *156*, 261 (1949).

[2] S. M. HILTON and G. P. LEWIS, J. Physiol. *128*, 235 (1955); *129*, 253 (1955). – R. H. FOX and S. M. HILTON, J. Physiol. *142*, 219 (1958). – L. F. CHAPMAN, A. RAMOS, H. GOODELL, G. SILVERMAN, and H. G. WOLFF, Arch. Neurol. *3*, 223 (1960).

[3] D. F. ELLIOT, E. W. HORTON, and G. P. LEWIS, J. Physiol. *153*, 473 (1960).

[4] L. F. CHAPMAN, A. RAMOS, A. CORRADO, and V. FORTES, Arch. Neurol. *3*, 43 (1960).

[5] R. A. BOISSONNAS, S. GUTTMANN, P. A. JAQUENOUD, H. KONZETT, and E. STÜRMER, Exper. *16*, 326 (1960). – D. F. ELLIOTT, G. P. LEWIS, and E. W. HORTON, Biochem. biophys. Res. Comm. *3*, 87 (1960). – H. KONZETT and R. A. BOISSONNAS, Exper. *16*, 456 (1960). – D. F. ELLIOT, E. W. HORTON, and G. P. LEWIS, Biochem. J. *78*, 60 (1961).

[6] D. BOVET, M. VIRNO, G. L. GATTI, and A. CARPI, Arch. int. Pharmacodyn. *110*, 380 (1957).

[7] R. C. URSILLO and A. CARPI, in preparation.

of natural crude, highly purified and of synthetic bradykinin[8] were compared with the action exerted by histamine[9].

A clear cerebral vasodilator effect of bradykinin was observed in all experiments. Bradykinin injected intravenously in doses ranging between 3 and 10 U/kg for the natural crude and between 0.5 and 3 μg/kg for the natural highly purified and synthetic preparations, regularly produced in dogs under good experimental conditions a lowering of the arterial pressure and a simultaneous increase in the intracranial venous pressure (Figure 1, 2); according to previous observations[10], as no changes in the central venous pressure were observed with these doses of bradykinin, this type of reaction must be considered the consequence of a reduction in cerebral vascular resistance; this is further demonstrated by the observation that the increase in the intracranial venous pressure provoked by bradykinin is accompanied by a rise in the intracranial venous outflow (Figure 1). The vessels of the nasal mucosa exhibited, on the contrary, a very low sensitivity to the vasodilator effect of bradykinin (Figure 2). In six experiments of this type, a slight nasal vasodilator response was observed only in one case, whereas, in the other 5, no response or a delayed and slight constriction was obtained. The effects of bradykinin on arterial pressure and cerebral vessels were accompanied by an increase in heart rate and a slight stimulation of respiration (Figure 2).

All these effects are very transient; they last no more than 30–60 sec and no tachyphylaxis is seen with repeated administration of the polypeptide. They persist with the same intensity even after the administration of doses of pyrilamine or atropine which inhibit the cerebral vasodilator effect of histamine or, respectively, of acetylcholine.

If the action of bradykinin is compared with that exerted by histamine, it is evident that a cerebral vasodilator response of similar intensity and duration can be obtained with the same or a slightly lower dose of histamine. Generally, the ratio between doses of bradykinin and of histamine equally active on the cerebral vessels ranges between 0.8 and 2. Though the intensity of the effects of bradykinin and histamine differed by not more than twofold in respect to the hypotension and tachycardia, a clear difference exists between their effects on the nasal vessels which always respond with a definite vasodilatation to histamine. In contrast to bradykinin, histamine in the doses employed did not exert any clear influence on respiration (Figure 2).

These results indicate that the cerebral vessels show a great sensitivity to the vasodilator action of bradykinin; this fact and the observation that the same sensitivity is not exhibited by the nasal vessels, which generally react to other vasoactive drugs in the same manner as the cerebral vessels[11], appears to be a good indication of the possible rôle played by bradykinin in the physiopathological control of brain circulation.

Zusammenfassung. Die Wirkung von natürlichem und synthetischem Bradykinin auf den cerebralen Kreislauf wurde beim Hund in Chloralosenarkose durch die Registrierung des intracraniellen Venendruckes und Blutausflusses und des Nasenhöhlenplethysmogrammes untersucht. Bradykinin erzeugt in Dosen von 0.5–3 μg/kg i.v. eine deutliche Erweiterung der Hirngefässe, analog der durch eine gleiche oder etwas niedrigere Menge von Histamin hervorgerufenen. Im Gegensatz zum Histamin übt Bradykinin in dieser Dosierung keine erweiternde Wirkung auf die Nasenhöhlengefässe aus. Die durch Bradykinin erzeugte Zunahme der Gehirndurchblutung wird durch Neoantergan oder Atropin nicht gehemmt.

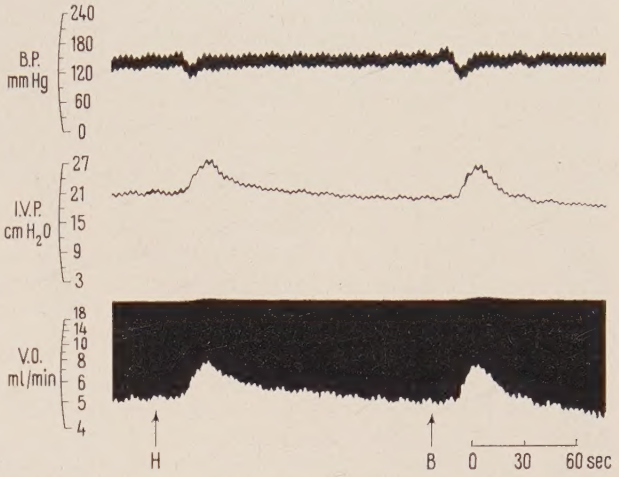


Fig. 1. Cerebral vasodilator action of natural crude bradykinin (B = 3 U/kg i.v.) and of histamine (H = 1 μg/kg i.v.). B.P. = femoral blood pressure (mm Hg). I.V.P. = intracranial pressure (cm H_2O). V.O. = outflow from the superior sagittal sinus (ml/min). Female dog, 19.5 kg (10/21/60) chloralose (100 mg/kg i.v.).

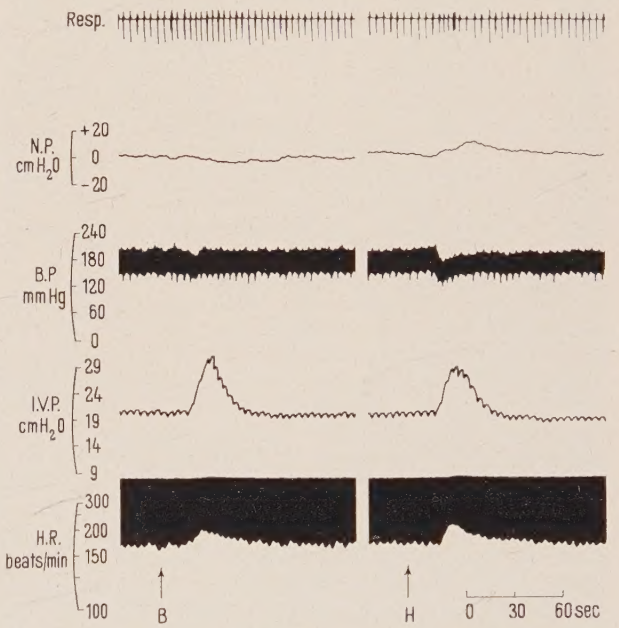


Fig. 2. Cerebral vasodilator effect of natural highly purified bradykinin (B = 1.5 μg/kg i.v.) and of histamine (H = 1 μg/kg i.v.). Resp. = Respiration. N.P. = nasal plethysmogram. B.P. = femoral arterial pressure (mm Hg). I.V.P. = intracranial venous pressure (cm H_2O). H.R. = heart rate (beats/min). Male dog, 16 kg (11/28/60) chloralose (100 mg/kg i.v.). The tracing shows a vasodilator effect both on the cerebral and nasal vessels with histamine, but only on the cerebral vessels with bradykinin.

A. Carpi and A. Pinto Corrado[11]

Istituto Superiore di Sanità, Roma (Italy), April 4, 1961.

[8] We should like to express our thanks to Prof. M. Rocha y Silva for the supply of the natural crude bradykinin, to Dr. G. P. Lewis of the National Institute for Medical Research (London) for the natural highly purified sample and to Dr. A. Cerletti of Sandoz Ltd. (Basle) for the synthetic preparation.

[9] M. Virno, S. B. Gertner, and D. Bovet, J. Pharmacol. exp. Therap. *118*, 63 (1956).

[10] D. Bovet, A. Carpi, and M. Virno, Exper. *16*, 1 (1960).

[11] Present address: Department of Pharmacology, University of Riberao Preto, S. Paulo (Brazil).

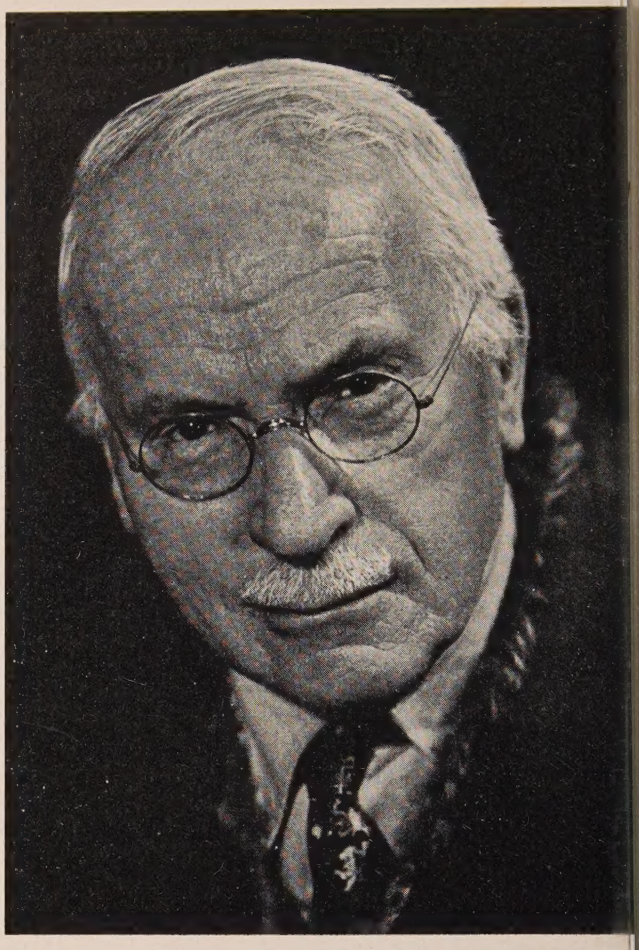
IN MEMORIAM

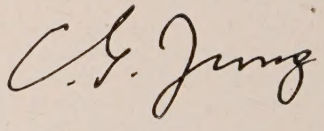
C. G. Jung

IDEA EST CONCEPTUS ARCHETYPUS.
KANT

Am 6. Juni 1961 ist CARL GUSTAV JUNG, Professor an der Universität Basel und am Eidgenössischen Polytechnikum Zürich, kurz vor der Vollendung des 86. Lebensjahres (26. Juli) in seinem Küsnachter Heim am Zürichsee verstorben. Ohne Frage der philosophischste Kopf unter den analytischen Psychologen und ohne Zweifel der geniale Forscher, dessen Tiefenpsychologie sowohl Naturwissenschaft wie auch Geisteswissenschaft umfasst hat. Immer wieder betonte er, dass er Naturwissenschafter und Empiriker sei und sich in allen seinen Aussagen auf das Erfahrbare beschränke. Das Substrat seiner Forschungen – die «schöpferische Phantasie» und deren rational-irrationale Produkte – wollte er mit Methoden der Naturwissenschaft untersuchen! Vor mehr als einem halben Jahrhundert begann er mit experimentalpsychologischen Assoziationsstudien, deren fundamentale Ergebnisse zum Begriff des *Komplexes* geführt haben. Eine Neufassung und Erweiterung des Freudschen Libidobegriffs wird allgemein biologisch begründet und erfolgt aus der Sicht des Energetikers. JUNGS Hypothese eines «artgemässen kollektiven Unbewussten» und die daraus entwickelte Lehre von dessen bewusstseinsfähigen Inhalten, die er «Archetypen» nannte, entstammt wiederum einer biologischen Konzeption. Danach sind die Archetypen keine «unbewussten Vorstellungen», sondern rein formale Faktoren, die unbewusste, seelische Vorgänge als «patterns of behaviour» anordnen; sie sind angeborene Reaktionsnormen, «Dispositionen und Bereitschaften», welche auch beim Tier die Instinkthandlungen ermöglichen. Die Begriffe der modernen Verhaltensphysiologie und Tierpsychologie, «Auslöser», «Releaser», «angeborenes Schema», «angeborener auslösender Mechanismus», bezeichnen bekanntlich zentralnervöse Strukturen, die gestalthaft geordnet, art-, typische Verhaltensweisen beim Tier induzieren. JUNG hat erst relativ spät auf den Zusammenhang seiner Archetypen mit den «Auslösern» hingewiesen. Sein «Nachweis», dass die Archetypen spontane Bildungen sind, die jederzeit und überall wiederentstehen können, «und zwar in einer Art und Weise, welche durch keine Übermittlung von aussen beeinflusst wird», ist von epochaler Bedeutung gewesen, ergibt sich doch, dass in jeder Psyche unbewusste aber hochaktive Tendenzen oder Bereitschaften vorhanden sind, «die unser Denken, Fühlen und Handeln instinktmässig beeinflussen».

Ein beträchtlicher Teil des Gesamtwerkes von C. G. JUNG befasst sich mit den Problemen der Differenzierung und Bewusstwerdung des Unbewussten, dem sogenannten «Individuationsprozess». Verschiedene psychische Gesetzmässigkeiten wurden dabei ermittelt: Die Grundregel von der Erhaltung der psychischen Energie, der psychischen Totalität, der kompensatorisch-komplementäre Charakter psychischer Vorgänge, und nicht zuletzt die Funktionslehre der Archetypen selbst. Zusammen mit der Jungschen Typenlehre gehören diese Befunde heute längst zum eisernen Wissensbestand der psychologischen Wissenschaften. Daneben aber ist es von jeher ein Hauptanliegen dieses erstaunlich vielseitigen Pioniers gewesen, auf rational unfassbare Vorgänge und Erscheinungen aufmerksam zu machen, auf eine besondere Klasse von «Naturereignissen», die ursachelos sein sollen. Er zögerte nicht, neben

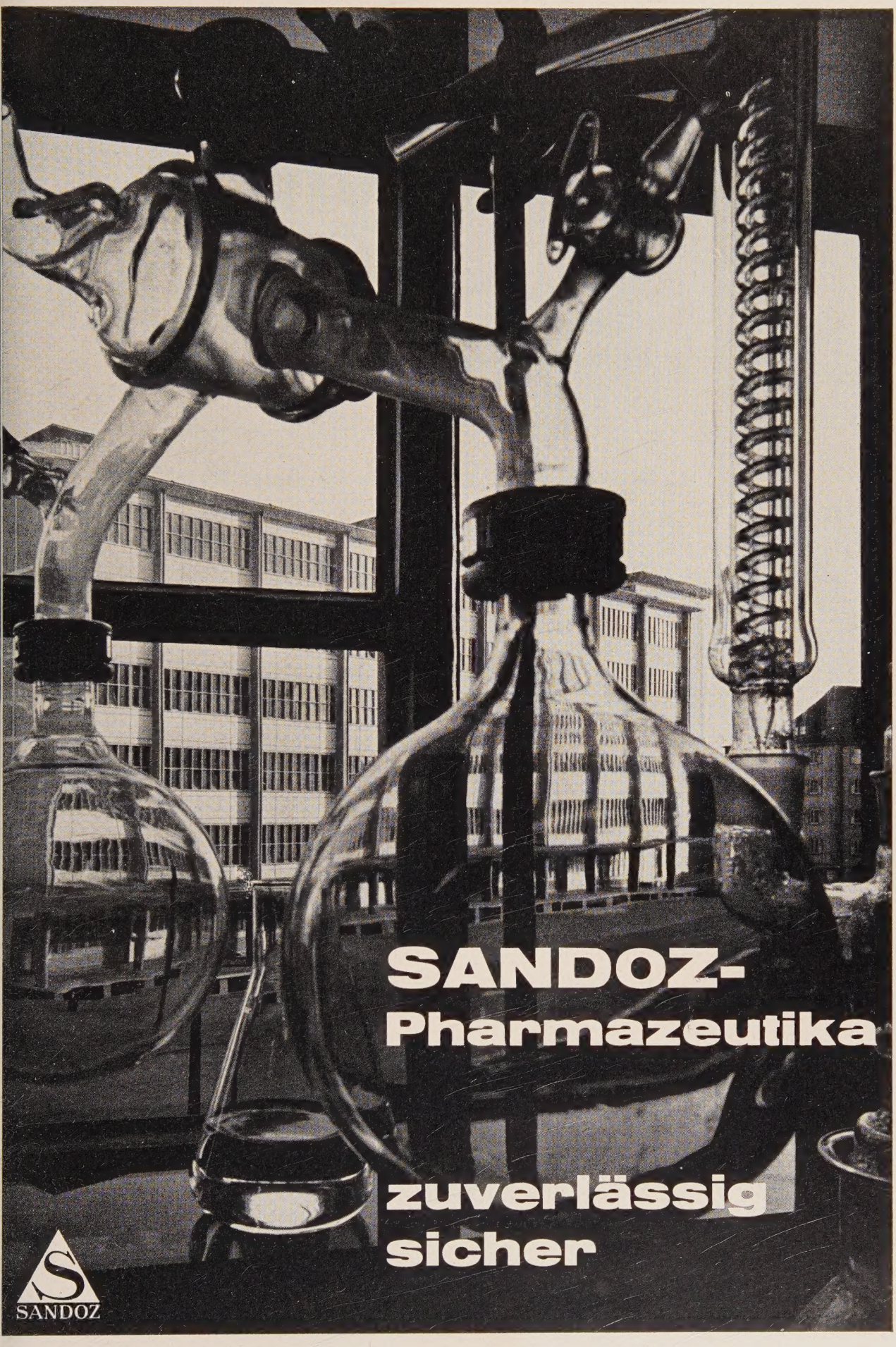




Raum, Zeit und Kausalität eine weitere und vierte Kategorie als «Synchronizität» («akausale Gleichzeitigkeiten») einzuführen. Darunter wird – zusammen mit dem Physiker W. PAULI – ein inkonstanter Zusammenhang der Ereignisse durch Kontingenz oder Zuordnung verstanden. Das Buch «Naturerklärung und Psyche» (1955), welches diese Dinge behandelt – Produkt der Zusammenarbeit von Psychologe und Physiker –, enthält so viele kühne Vorstösse ins Reich des Irrationalen, auch so viele gewagte Gedankengänge des Psychologen, dass sich der strenge Naturwissenschafter zu grösster Wachheit und Kritikbereitschaft aufgerufen sieht.

Nicht das kleinste Verdienst von C. G. JUNG besteht darin, dass er mit seiner Tiefenpsychologie den phänomenalen Versuch unternommen hat, die Bereiche des Rationalen und Irrationalen zusammen zu schauen, ohne dabei der reinen Spekulation zu erliegen. Auch dafür schuldet ihm die abendländische Wissenschaft bleibenden Dank. Sie wird in ihm einen ihrer grossen Anreger, Wegbereiter und Synthetiker verehren können.

H. MISLIN


SANDOZ-
Pharmazeutika
zuverlässig
sicher
SANDOZ

Jetzt erhältlich, 90-95% rein

Coenzym A

10 mg $ 7.30	250 mg $ 146.—
52 mg $ 16.—	500 mg $ 230.—
100 mg $ 60.—	

Weitere Biochemikalien höchster Reinheit:

Ubichinon-30 (Coenzym Q_6)

6-Thioctsäure (d,l-α-Liponsäure)

6,8-Dithiol-octancarbonsäure (reduzierte d,l-α-Liponsäure)

6-Thioctsäureamid (d,l-α-Liponsäure-amid)

6,8-Dithiol-octancarbonsäureamid (reduziertes d,l-α-Liponsäure-amid)

6-Thioctsäureglycinamid, Natriumsalz

Diphosphopyridin Nucleotid (DPN)

Thiamin Monophosphat

Thiamin Pyrophosphat (Cocarboxylase)

Pyridoxal-5′-phosphat (Codecarboxylase)

Industrielle Mengen sind auch lieferbar

Biochemische Abteilung
FARMOCHIMICA
CUTOLO
CALOSI S.p.A.

Postfach 332 Neapel (Italien)